

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DEL VENENO DE LAS ESPECIES *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* Y *Micrurus lemniscatus* DE COLOMBIA.**

Janeth Alejandra Bolívar Barbosa

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá, Colombia  
2019



# **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DEL VENENO DE LAS ESPECIES *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* Y *Micrurus lemniscatus* DE COLOMBIA.**

Janeth Alejandra Bolívar Barbosa

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Magister en Toxicología

Director:

Dr. Sci. MSc. Edgar Antonio Reyes Montaña

Codirectora:

MSc, Dr. Sci. (c) Ariadna Lorena Rodríguez Vargas

Codirector:

M.V. Francisco Javier Ruiz Gómez

Línea de Investigación:  
Diseño y evaluación de péptidos con actividad biológica.  
Grupo de Investigación:  
Grupo de Investigación en Proteínas- GRIP

Grupo de Investigación:  
Grupo de investigación en animales ponzoñosos y sus venenos de la Dirección de  
Producción del Instituto Nacional de Salud

Línea de Investigación:  
Toxinología  
Grupo de Investigación:  
Toxicología ambiental y ocupacional -TOXICAO

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Maestría en Toxicología  
Bogotá, Colombia  
2019

*A mi familia, sin ellos esto no hubiera sido posible.*



## Agradecimientos

Creo que este es quizás uno de los últimos capítulos en escribir, en el cual me gustaría mostrar mi más sincera gratitud a todos aquellos que hicieron posible el desarrollo del proyecto.

Quisiera empezar por agradecer a los doctores Edgar Antonio Reyes Montaña y Nohora Angélica Vega Castro, por acogerme en su laboratorio y su grupo de investigación, guiarme en cada uno de los pasos a desarrollar en la tesis y apoyarme en esta gran labor de investigación.

De manera particular me gustaría agradecer a mi director de tesis Edgar Antonio Reyes Montaña y a mis codirectores Ariadna Lorena Rodríguez Vargas Candidata a doctorado en Ciencias- bioquímica y Francisco Javier Ruiz Gómez profesional especializado de la Hacienda Galindo y Serpentario de la dirección de Producción del Instituto Nacional de Salud; quienes de diferentes maneras realizaron un seguimiento continuo de las actividades desarrolladas a lo largo de este proceso.

A mi codirectora Ariadna Lorena Rodríguez Vargas, de manera particular quisiera agradecerle todo su apoyo y acompañamiento, especialmente en aquellas largas jornadas continuas de trabajo en el laboratorio, así como por su amistad durante esta travesía.

A mis compañeros de laboratorio y grupo de investigación: Ángel Pérez (Magister en bioquímica), Jessica Espinosa (Estudiante de maestría en bioquímica), Nury Vargas (Candidata a doctorado en Bioquímica), Zulma Casas (Candidata a doctorado en Biotecnología), Shaha Noor Alam (Estudiante de química farmacéutica), David Usuy (Estudiante de biología), y a mi codirectora Ariadna Lorena Rodríguez Vargas, por

## II Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

---

apoyarme académicamente durante mi estadía en laboratorio, por compartir sus consejos y experiencias, y por hacer que el ambiente del laboratorio fuera ameno y divertido, haciendo que nuestras labores no cayeran en la monotonía.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud por permitirme desarrollar mi tesis con ellos, de manera particular al personal de la Hacienda Galindo y serpentario del INS (Mónica Sarmiento, Carlos Castro, Juan Pablo Hurtado, José Peña), por su hermosa labor en el mantenimiento y trazabilidad del veneno de las serpientes empleadas en la tesis. De igual forma agradezco a la profesional del grupo de Aseguramiento de la Calidad Luz Mila Pinzón responsable del desarrollo de las pruebas biológicas DL50 y dosis mínima coagulante de los venenos, quien estuvo muy pendiente del desarrollo de las mismas y apoyo al máximo el proyecto. Al bioterio ABSL-2 y a su personal por apoyarme con las salas de experimentación y animales para el desarrollo de las diferentes pruebas, en especial al veterinario Camilo Andrés Salamanca. Gracias a la colaboración del personal del INS la cual fue muy valiosa en el proyecto.

Agradezco al Ministerio de Medio Ambiente, por dar los permisos necesarios para trabajar con el veneno completo de las especies objeto de estudio en la tesis.

No podría terminar esta sección sin agradecerle a aquellas personas que vivieron conmigo día tras día el desarrollo de mi trabajo, los días felices, los días largos, las madrugadas, las traspasadas, el malgenio y el buen genio, por su apoyo, amor, sus sonrisas, sus abrazos, por no permitirme abandonar y mostrarme que las adversidades por más duras que sean pueden ser enfrentadas, agradezco a mis padres Janeth Mercedes Barbosa Gutiérrez y Edgar Samuel Bolívar Clavijo, mis hermanos Edgar Sebastián Bolívar Barbosa, Fausto Camilo Bolívar Barbosa y a mi novio Iván Rodrigo Astros Fonseca, sin su apoyo constante no hubiera sido posible desarrollar el proyecto en el tiempo planteado.

Quisiera cerrar la sección agradeciendo a toda la gente que tras bambalinas apoyaron indirectamente el trabajo ingenieros, proveedores (AM LTDA.), personal administrativo.



## Resumen

Los venenos de las serpientes del género *Micrurus* han sido poco estudiados debido a las dificultades existentes en su recolección, mantenimiento y bajas cantidades producidas por individuo. Los venenos de las serpientes del género *Micrurus* o corales verdaderas son conocidos principalmente por sus efectos neurotóxicos, de tipo postsináptico o presináptico ejerciendo un bloqueo sobre la placa neuromuscular, el cual desencadenará en el peor de los casos una parálisis respiratoria y muerte. *Micrurus medemi* y *Micrurus sangilensis* son especies endémicas de Colombia, ubicadas en la región Orinoquía y región Andina y sus venenos no han sido objeto de estudio al momento. *Micrurus lemniscatus*, se distribuye en la región cis-andina, en la cuenca amazónica y del Orinoco. Para esta especie se ha estudiado el veneno sólo de las poblaciones de Brasil, pero poco se conoce de las colombianas. Por medio de un abordaje bioquímico fue posible determinar que estos tres venenos presentaban variaciones interespecíficas, poseían diferentes compuestos en un amplio intervalo de masa molecular (10-133kDa), pero con un predominio de elementos <26kDa, presentaron actividad PLA<sub>2</sub>, poseen actividad hialuronidasa (entre 68 y 76kDa) y actividad proteasa la cual en general fue baja pero bien definida para el veneno de *M. lemniscatus* en sustrato de caseína. Los venenos redujeron la viabilidad celular en cultivo primario de neuronas hipocámpales (*M. lemniscatus* 30%, *M. medemi* 50% y *M. sangilensis* 25%) y en línea HTB-132 de cáncer de seno (*M. lemniscatus* 30%, *M. medemi* 60% y *M. sangilensis* 30%). Este tipo de caracterizaciones contribuyen en la generación de conocimiento en el área de la toxínología.

Palabras clave: *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis*, fosfolipasas A<sub>2</sub>,

## Abstract

The *Micrurus* snake's venom has been slightly studied due to the difficulties in their collection, maintenance and low quantities produced by each animal. This are known mainly for their neurotoxic effects, postsynaptic or presynaptic, exerting a block at the neuromuscular plate, which will trigger, in worst cases, respiratory paralysis and death. *Micrurus medemi* and *Micrurus sangilensis* are endemic species from Colombia, located in the Orinoquía region and the Andean region, and have not been studied at the moment. *Micrurus lemniscatus*, is distributed in the cis-andean region, the Amazon basin and Orinoco basin. For this specie the venom has been studied only in Brazil, and little is known about the Colombian species. Due to a biochemical approach, was possible to determine that these three venoms showed interspecific variations, possessed different compounds in a wide range of molecular mass (10-133kDa), but with a predominance of elements less than 26kDa; presented PLA<sub>2</sub> activity, hyaluronidase activity (between 68 and 76 kDa) and protease activity, which in general was low but well defined for the venom of *M. lemniscatus* in casein substrate. Venom reduced cell viability in primary culture of hippocampal neurons (*M. lemniscatus* 30%, *M. medemi* 50% and *M. sangilensis* 25%) and HTB-132 line of breast cancer (*M. lemniscatus* 30%, *M. medemi* 60% and *M. sangilensis* 30%). This type of characterization contributes to the generation of knowledge in the area of toxinology.

Keywords: *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis*, Phospholipases

# Contenido

	Pág.
Agradecimientos .....	I
Resumen .....	III
Abstract.....	IV
Contenido .....	V
Lista de figuras.....	VII
Lista de tablas .....	IX
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	X
Introducción .....	1
1. Definición del problema de investigación .....	3
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Pregunta de investigación .....	5
1.3 Justificación.....	5
1.4 Objetivos .....	6
1.4.1 Objetivo General.....	6
1.4.2 Objetivos específicos .....	6
2. Caracterización bioquímica del veneno de <i>Micrurus</i> .....	7
2.1 Características de las serpientes del género <i>Micrurus</i> .....	7
2.2 Serpientes <i>Micrurus</i> colombianas.....	9
2.2.1 <i>Micrurus lemniscatus</i> LINNAEUS, 1758.....	10
2.2.2 <i>Micrurus medemi</i> ROZE, 1967.....	11
2.2.3 <i>Micrurus sangilensis</i> NICEFORO MARÍA, 1942.....	11
2.3 Características del veneno de serpientes <i>Micrurus</i> .....	12
2.3.1 Fosfolipasa A <sub>2</sub> - PLA <sub>2</sub> .....	12
2.3.2 Toxinas de tres dedos (3FTx) .....	15
2.3.3 Otros grupos peptídicos y proteicos presentes en el veneno. ....	16
2.4 Caracterización bioquímica del veneno de <i>Micrurus</i> .....	22
2.4.1 Estado del arte .....	23
2.5 Desarrollo metodológico.....	26
2.5.1 Obtención del veneno.....	26

2.5.2	Cuantificación de proteína total en el veneno. ....	29
2.5.3	Identificación del perfil peptídico y proteico del veneno de <i>Micrurus lemniscatus</i> , <i>M. medemi</i> y <i>M. sangilensis</i> . ....	29
2.6	Resultados. ....	31
2.6.1	Cuantificación de proteína. ....	31
2.6.2	Electroforesis SDS-PAGE ....	32
2.6.3	Resultados Cromatografía por RP-HPLC ....	36
2.6.4	Resultados Bidimensional ....	38
2.7	Discusión ....	41
<b>3.</b>	<b>Caracterización enzimática. ....</b>	<b>45</b>
3.1	Estado del arte. ....	45
3.1.1	Actividad PLA <sub>2</sub> . ....	45
3.1.2	Actividad hialuronidasa. ....	47
3.1.3	Actividad Proteasa ....	48
3.2	Desarrollo metodológico ....	49
3.2.1	Actividad PLA <sub>2</sub> cualitativo. ....	49
3.2.2	Actividad PLA <sub>2</sub> cuantitativo. ....	49
3.2.3	Actividad Hialuronidasa ....	50
3.2.4	Actividad Proteasa ....	50
3.3	Resultados. ....	51
3.3.1	Actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> ....	51
3.3.2	Actividad proteasa. ....	52
3.3.3	Actividad hialuronidasa. ....	54
3.4	Discusión ....	55
<b>4.</b>	<b>Evaluación actividad biológica del veneno. ....</b>	<b>58</b>
4.1	Estado del arte. ....	58
4.1.1	Dosis Letal 50 ....	58
4.1.2	Actividad coagulante ....	59
4.1.3	Citotoxicidad. ....	60
4.2	Metodología. ....	62
4.2.1	Dosis Letal 50. ....	62
4.2.2	Actividad coagulante. ....	62
4.2.3	Citotoxicidad. ....	63
4.3	Resultados. ....	64
4.3.1	Dosis letal 50. ....	64
4.3.2	Actividad coagulante ....	65
4.3.3	Citotoxicidad. ....	65
4.4	Discusión ....	71
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones ....</b>	<b>75</b>
5.1	Conclusiones ....	75
5.2	Recomendaciones ....	76
<b>6.</b>	<b>Bibliografía. ....</b>	<b>97</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 2-1.</b> Especies de <i>Micrurus</i> en el presente estudio.....	11
<b>Figura 2-2.</b> Perfil electroforético de especies de <i>Micrurus</i> .....	23
<b>Figura 2-3.</b> Perfil electroforético de <i>Micrurus tener</i> .....	24
<b>Figura 2-4.</b> Cromatografía y perfiles electroforéticos de <i>Micrurus dumerilii</i> y <i>M mipartitus</i> .....	25
<b>Figura 2-5.</b> Perfil Electroforético y cromatográfico de <i>Micrurus lemniscatus</i> .....	26
<b>Figura 2-6.</b> Ubicación geográfica serpientes <i>Micrurus</i> . .....	28
<b>Figura 2-7.</b> Electroforesis Laemmli SDS-PAGE Tris-glicina 12,5% de <i>Micrurus lemniscatus</i> , <i>M medemi</i> y <i>M sangilensis</i> .....	33
<b>Figura 2-8.</b> Electroforesis SDS-PAGE Tris-tricina 15% de <i>Micrurus lemniscatus</i> , <i>M medemi</i> y <i>M sangilensis</i> .....	35
<b>Figura 2-9.</b> Cromatograma múltiple HPLC-RP C <sub>18</sub> de cada uno de los venenos de <i>Micrurus</i> .....	37
<b>Figura 2-10.</b> Electroforesis bidimensional <i>Micrurus lemniscatus</i> .....	39
<b>Figura 3-1.</b> Actividad PLA <sub>2</sub> de veneno de serpientes del género <i>Micrurus</i> (70).....	46
<b>Figura 3-2.</b> Evaluación actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> del veneno de ML1, Mm1 y Ms1 .....	52
<b>Figura 3-3.</b> Zimograma actividad proteasa en gel co-polimerizado con caseína 0,8% en venenos de <i>Micrurus</i> .....	53
<b>Figura 3-4.</b> Zimograma actividad proteasa gel co-polimerizado con gelatina (Cf 1,5 mg/mL) en venenos de <i>Micrurus</i> .....	54
<b>Figura 3-5.</b> Zimograma actividad hialuronidasa venenos <i>Micrurus</i> .....	55
<b>Figura 4-1.</b> Hipocampo en ratas posterior a inoculación intrahipocampal. ....	61
<b>Figura 4-2.</b> Porcentaje de viabilidad en cultivo primario de neuronas hipocámpales de rata Wistar tratadas con ML1 .....	66

<b>Figura 4-3.</b> Porcentaje de viabilidad en cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar con Mm1.....	67
<b>Figura 4-4.</b> Porcentaje de viabilidad en cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar tratadas con Ms1 .....	68
<b>Figura 4-5.</b> Porcentaje de Viabilidad celular en línea HTB-132 tratada con ML1 .....	69
<b>Figura 4-6.</b> Porcentaje de Viabilidad de la línea celular HTB-132 tratada con Mm1 .....	70
<b>Figura 4-7.</b> Porcentaje de viabilidad de la línea celular HTB-132 tratada con Ms1 .....	71

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1.</b> Especies de serpientes <i>Micrurus</i> colombianas.....	9
<b>Tabla 2-2.</b> Fosfolipasas del grupo 1 identificadas en elápidos.....	13
<b>Tabla 2-3.</b> Toxinas de tres dedos (3FTx) identificadas en elápidos (32,40,41).....	15
<b>Tabla 2-4.</b> Otros componentes peptídicos y proteicos en el veneno de elápidos.....	16
<b>Tabla 2-5.</b> Componentes proteicos identificados en especies del género <i>Micrurus</i> .....	20
<b>Tabla 2-6.</b> Venenos empleados en el estudio .....	27
<b>Tabla 2-7.</b> Identificación de venenos.....	29
<b>Tabla 2-8.</b> Cuantificación de proteína total presente en los venenos de trabajo.....	31
<b>Tabla 2-9.</b> Distribución de bandas en gel SDS-PAGE-Tris-glicina 12,5%.....	32
<b>Tabla 2-10.</b> Bandas con migración similar en gel SDS-PAGE-Tris-glicina 12,5%.....	34
<b>Tabla 2-11.</b> Bandas obtenidas en gel SDS-PAGE-Tris-tricina 15%.....	34
<b>Tabla 2-12.</b> Bandas con patrón de migración similar en gel SDS-PAGE-Tris-Tricina 15% .....	36
<b>Tabla 2-13.</b> Tiempos de retención para las fracciones obtenidas en los venenos de <i>Micrurus</i> .....	37
<b>Tabla 3-1.</b> Especies de <i>Micrurus</i> con determinación de actividad fosfolipasa .....	45
<b>Tabla 3-2.</b> Especies de <i>Micrurus</i> con determinación de actividad enzimática .....	47
<b>Tabla 3-3.</b> Venenos del género <i>Micrurus</i> con caracterización de la actividad proteasa ..	48
<b>Tabla 4-1.</b> DL <sub>50</sub> venenos de <i>Micrurus</i> .....	58
<b>Tabla 4-2.</b> Venenos con determinación de actividad coagulante.....	59
<b>Tabla 4-3.</b> Dosis letal <sub>50</sub> venenos de <i>Micrurus</i> .....	65

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
C°	Temperatura	C°	$C^{\circ} = K^{\circ} - 273$
Da	Masa	Da	$1,66 \times 10^{-27} \text{ Kg}$
Mg	Masa	mg	$10^{-3} \text{ g}$
ML	Volumen	mL	$10^{-3} \text{ L}$
UV	Radiación ultravioleta	UV	$4 \times 10^{-7} \text{ a } 1,5 \times 10^{-8} \text{ m}$

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μg	Masa	μg	$10^{-6} \text{ g}$
μL	Volumen	μL	$10^{-6} \text{ L}$

### Subíndices

Subíndice	Término
E	Experimental

### Superíndices

Superíndice	Término
N	Exponente, potencia



## Abreviaturas

Abreviatura	Término
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
mAChR	Receptor muscarínico de acetilcolina
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NSF-1	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein, proteína de fusión sensible a la N-etilmaleimida
PDK	Poli-D-Lisina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PNBM	Primary Neuron Basal Medium
PNGM	Primary Neuron Growth Medium
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
UA	Unidades de Absorbancia
3FTx	Toxinas de tres dedos -Three finger toxin



# Introducción

El accidente ofídico es un evento de interés en salud pública para la región de centro y sur América. Registra un estimado anual de 300.000 mordeduras, 12.000 eventos generadores de secuelas y alrededor de 4.000 muertes (1). De acuerdo con el boletín epidemiológico del accidente ofídico del SIVIGILA, para el 2018 en el periodo epidemiológico XI en Colombia, se presentaron al sistema nacional de vigilancia en salud pública 4.441 casos clínicos confirmados de accidente ofídico, de los cuales 63 fueron ocasionados por serpientes del género *Micrurus* (2).

El veneno de las serpientes de forma general, es una mezcla compleja de componentes orgánicos e inorgánicos, que van a generar diversas manifestaciones metabólicas y fisiológicas, ocasionando alteraciones en la homeóstasis, encaminado a la inmovilización, digestión y muerte de la presa por parálisis respiratoria o cardíaca, para su alimentación, o como mecanismo de defensa (3,4).

En el caso de los venenos de las serpientes del género *Micrurus* estos son conocidos principalmente por sus efectos neurotóxicos, de tipo postsináptico al unirse al receptor nicotínico de manera competitiva en la unión neuromuscular o de tipo presináptico alterando la liberación de acetilcolina en la neurona presináptica (3,5,6), llevando en cualquiera de las dos situaciones a una parálisis respiratoria de su presa, como parte de su mecanismo de alimentación, o muerte del paciente si no se realiza un tratamiento adecuado y oportuno.

La caracterización del veneno de serpientes del género *Micrurus* posee varias limitaciones asociadas en primera instancia a la colecta del espécimen, debido a que su comportamiento se relaciona con los hábitos fosoriales y nocturnos. De forma

complementaria, se encuentra la dificultad de mantener estas especies en cautiverio, debido a su baja adaptación y las exiguas cantidades de veneno que son producidas y recuperadas en los procesos de extracción (3,7,8).

De las especies del género *Micrurus* que han sido estudiadas para determinar su perfil proteico, tan solo 18 de 85 venenos fueron analizados mediante un enfoque proteómico hasta el año 2016 de acuerdo a la información publicada por Lomonte (9). Para el año 2018 y 2019 se incluyen estudios en *Micrurus pyrrhocryptus* (10) y *Micrurus roatanus* (11) respectivamente. El género *Micrurus* tiene 80 especies descritas (The Reptile data base), distribuidas en el continente americano y es el género más diverso y representativo de la familia Elapidae, contando con 29 especies (7,12).

De estas 29 están en Colombia, pero solo se ha desarrollado investigaciones con seis venenos de especies del país, entre las cuales se encuentran *M. mipartitus* (6,13–15), *M. dumerilii* (14,16), *M. dissoleucus* (6), *M. lemniscatus* (17), *M. spixii* (17) y *M. surinamensis* (17).

# 1. Definición del problema de investigación

## 1.1 Planteamiento del problema

Colombia por su ubicación, terreno, clima y vegetación, es un país con gran biodiversidad en el cual se han identificado 9 familias, 76 géneros y más de 300 especies de serpientes, de las que sólo 49 son venenosas, pertenecientes a las familias Viperidae y Elapidae. El género *Micrurus* es el más diverso y representativo de la familia Elapidae, contando con 28 especies identificadas al momento (7,12). Estas serpientes presentan dificultades en su mantenimiento en cautiverio, principalmente por problemas asociados con la adaptación a la dieta, ya que la gran mayoría de ellas son de hábito ofiófago, sin embargo, también pueden alimentarse de animales vermiformes como lagartos, cecilias, peces y algunos invertebrados (18). Adicionalmente, se encuentra reportada la escasa producción de veneno por ordeño (microlitros), generando una limitante en la disponibilidad y cantidad de sus venenos (7,8,18) y por ende la disposición del mismo para el estudio bioquímico.

El veneno de estas serpientes está constituido por diferentes familias de proteínas responsables de la toxicidad y letalidad. En mayor proporción se encuentran las  $\alpha$ -neurotoxinas y las  $\beta$ -neurotoxinas, estas dos, son responsables del bloqueo en la placa neuromuscular, subsecuente parálisis flácida y muerte de su presa o paciente (3–5,9,14). Las  $\alpha$ -neurotoxinas o toxinas de tres dedos (3FTx) se caracterizan por presentar un efecto postsináptico por su unión con el receptor nicotínico. En cambio, las  $\beta$ -neurotoxinas por su acción presináptica alteran la liberación del neurotransmisor acetilcolina. Este segundo grupo de toxinas se encuentra representado por las fosfolipasas  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) (3–5). Aunque el principal efecto biológico que ha sido descrito en estos venenos es la neurotoxicidad, de manera complementaria, también han sido reportadas en pruebas de laboratorio alteraciones en los parámetros de coagulación, generación de edema y miotoxicidad

#### 4 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

---

(9,14,19), actividades que de las especies del país no han sido desarrollados con los venenos objeto de estudio.

De la misma manera, la caracterización biológica *in vivo* e *in vitro* de los venenos de serpiente, entendida como el estudio de los potenciales efectos relacionados con la neurotoxicidad, miotoxicidad, actividad desfibrinante, edematizante, actividad hialuronidasa, fosfolipasa A<sub>2</sub> y actividad proteolítica entre otras, constituye un elemento importante en la determinación de la toxicidad de los componentes de los venenos de serpiente (20–22), por lo que se optó por evaluar algunas de estas actividades de forma complementaria, con el fin de entender la diversidad de efectos tóxicos en estos venenos.

La proteómica, constituye hoy en día una línea prioritaria de investigación en el área de la biología y la toxicología, siendo definida como el conjunto de técnicas o tecnologías encaminadas a la obtención de información funcional de todas las proteínas. Tiene por objeto el análisis, identificación y caracterización del proteoma celular, de proteínas presentes en una célula, tejido u órgano en un estado de diferenciación, desarrollo y condiciones ambientales determinadas (23).

La caracterización proteómica de veneno de serpiente o venómica de serpientes, tiene una serie de beneficios con gran potencial para la investigación básica, diagnóstico clínico, desarrollo de nuevas herramientas de investigación y fármacos de uso clínico potencial, contribuyendo a una comprensión profunda de la evolución y los efectos biológicos de los venenos, a fin de generar protocolos de inmunización para producción de anticuerpos específicos para toxinas de serpientes con mayor especificidad y eficacia que los sistemas convencionales (23–25).

El conocimiento que se tiene está limitado a los efectos clínicos descritos en los cuadros agudos de intoxicación, sin contar con un desarrollo ni acercamiento sistemático y riguroso de las actividades bioquímicas de los venenos de estas especies. Es por esto, que la presente investigación busca identificar algunas características bioquímicas del veneno de tres especies del género *Micrurus*: *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* del territorio colombiano.

## 1.2 Pregunta de investigación

A partir de la caracterización bioquímica parcial de los venenos evaluados ¿Cuáles son los componentes proteicos que son propios y cuáles son comunes en los venenos de las serpientes colombianas *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus*?

## 1.3 Justificación

De las especies del género *Micrurus* que han sido estudiadas para determinar su perfil proteico, tan solo 18 de 85 venenos identificados de serpientes fueron analizados para el año 2016, es decir el 21% de los venenos de las especies registradas en la base de datos Reptile Database (9). Del 21 % anteriormente mencionado solo 2 han sido desarrollados con veneno de serpientes del país (*M. mipartitus* y *M. dumerilii*), donde se determinó el perfil proteico, así como una caracterización parcial de las actividades *in-vitro* e *in-vivo* de ambos venenos (14–16). Adicional a los venenos de especies colombianas anteriormente mencionados, también han sido realizadas caracterizaciones de la actividad neurotóxica con venenos de *Micrurus* como puede evidenciarse en el trabajo que desarrollo Camila Renjifo con venenos de *M. dissoleucus* y *M. mipartitus* del país (6).

Ya se han analizado los patrones electroforéticos y cromatográficos de algunos venenos de serpiente del género *Micrurus*, pero los estudios realizados con veneno de serpientes de Colombia son escasos, la investigación en este tema ha tenido poco desarrollo, debido a grandes dificultades en la colecta, mantenimiento, cautiverio y producción de veneno de este tipo de serpientes. Adicional a esto, es importante mencionar que los estudios realizados en vipéridos han demostrado variabilidad para cada uno de los componentes del veneno, en cuanto a proporción y presencia de proteínas, de acuerdo con especie, estado ontogénico y sitio de procedencia, por lo que el campo de estudio en lo referente a las toxinas de este grupo de animales es aún muy amplio e inexplorado.

El banco de venenos del INS – Instituto Nacional de Salud, cuenta con veneno de diferentes especies de *Micrurus* de diferentes localidades, que al momento no han sido estudiados. Es por esto que debido al conocimiento incipiente que se tiene de los venenos del país, junto con la gran biodiversidad de serpientes del género *Micrurus*, se hace

pertinente generar conocimiento en la rama de la toxínología y fomentar investigaciones en la caracterización de los venenos de serpientes involucrados en la presentación del accidente ofídico, como apoyo a la toxicología humana y veterinaria, así como generar conocimiento de los venenos de serpientes nativas que permitan ampliar la información existente de la gran biodiversidad de especies en el país. Mediante la determinación del perfil peptídico y proteico de los venenos, principales actividades enzimáticas, y actividades biológicas se busca orientar el diseño de mejores antivenenos.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo General

Caracterizar bioquímicamente de manera parcial los componentes peptídicos presentes en el veneno de las serpientes *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus*.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el perfil peptídico de los venenos de *M. medemi*, *M. sangilensis* y *M. lemniscatus* obtenidos mediante técnicas de separación.
- Evaluar la actividad enzimática de fosfolipasa A<sub>2</sub>, proteasa y hialuronidasa del veneno de *M. sangilensis*, *M. medemi* y *M. lemniscatus*.
- Identificar la toxicidad de los venenos mediante realización de pruebas de DL<sub>50</sub>, neurotoxicidad y actividad coagulante.



## **2. Caracterización bioquímica del veneno de *Micrurus***

### **2.1 Características de las serpientes del género *Micrurus***

Las serpientes son reptiles de cuerpo cilíndrico, sin apéndices locomotores y vertebrados, con escamas en su piel lo que las incluye al orden Squamata, carecen de párpados y oído externo por lo cual la detección de sus presas se realiza con base a la percepción de vibraciones del suelo. La mayoría de las serpientes coral tienen un patrón de color de alguna combinación de rojo, amarillo o blanco y negro, generalmente dispuestas en anillos, presentándose patrones monadales, triadas o bicolor (8).

En el mundo hay alrededor de 2900 especies de serpientes, distribuidas en 465 géneros y 20 familias, las cuales pueden encontrarse en una gran variedad de ambientes, de acuerdo a las necesidades de cada especie en cuanto a temperatura, humedad e intensidad lumínica. Pueden ser clasificadas como terrestres, arborícolas, fosoriales, semifosoriales, acuáticas y criptozoicas (3). Es importante mencionar que los hábitos alimenticios de las serpientes se caracterizan por ser de tipo carnívoro, determinado por las características propias (fisiológicas y ecológicas) de cada especie, lo que hace que se encuentren ubicadas en los eslabones altos de la cadena trófica, de ahí su importancia en el control y regulación de especies en los ecosistemas (3,7).

Las familias de serpientes venenosas de mayor importancia en materia de salud pública, en razón a la morbilidad y mortalidad en humanos reportada a estos reguladores son Viperidae y Elapidae (26), en el caso de nuestro país la primera familia se encuentra representada por víboras de los géneros *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Crotalus*, *Lachesis*, y *Porthidium* (7).

Los Elápidos son serpientes de hábitos terrestres, semifosoriales y acuáticos, esta familia se encuentra distribuida a nivel mundial y comprende 55 géneros. En América han sido descritos tres géneros *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Micruroides*. El género *Micrurus* es el más diverso con 50 especies descritas, distribuido en América desde Estados Unidos a Argentina en altitudes entre los 200 y 1300 msnm, se caracterizan por ser de hábitos fosoriales y no presentar comportamiento agresivo (3,7,8). Generalmente son animales dóciles, que usan el veneno como mecanismos de defensa, y alimentación, por lo cual no generan accidentes en el humano a menos que sean provocadas. A pesar de esto, son serpientes que poseen un veneno poderoso, un mecanismo de defensa y patrones de coloración específicos que sirven como mecanismo de defensa y alarma a sus depredadores (7,18). Estas características hacen que sea necesario conocer el aparato inoculador de veneno, y la composición de este.

El sistema de dentición de las serpientes es clasificado de acuerdo con la ausencia, presencia, ubicación y eficiencia de inoculación determinada por las características del colmillo inoculador de veneno. En general, el sistema de dentición de las serpientes se clasifica en: aglifo, opistoglifo, proteroglifo y solenoglifo; siendo este último el más especializado y presente en serpientes de la familia Viperidae (3,8,18).

En el caso de las serpientes de la familia Elapidae estas poseen una dentición proteroglifa, es decir que el colmillo inoculador de veneno se encuentra ubicado en el borde anterior del maxilar, para este tipo de dentición el surco por el cual pasa el veneno en el colmillo no se encuentra cerrado en su totalidad, razón por la cual es necesario que la serpiente sostenga la mordida para asegurar la entrada del veneno, adicionalmente al tipo de dentición existen otras particularidades como lo son la escasa longitud de los colmillos (2-3mm) y una reducida apertura bucal (30°), a diferencia de los vipéridos los cuales poseen un sistema de dentición más especializado con un surco completo que actúa inoculando el veneno en sus presas a manera de aguja hipodérmica (3,8).

La glándula de veneno, son estructuras bilaterales rodeadas por músculos abductores ubicadas en ambos maxilares en íntima relación con el músculo aductor externo profundo y finalizando a nivel de la túnica vaginal de los colmillos. La glándula de veneno de los





*Elápidos* está constituida por una glándula principal, un conducto secretor, una glándula mucosa accesoria. La glándula principal se encuentra rodeada por los músculos abductor externo superficialis y pterigoides (8,27,28).

El veneno es almacenado principalmente intracelularmente y en una baja proporción en el lumen central (27), hasta que éste es usado. La producción de toxinas en la glándula es estimulada por cambios bioquímicos y morfológicos realizados a nivel de las células epiteliales secretoras posterior al momento de extracción o inoculación del veneno de la serpiente. La producción de estas toxinas se realiza de forma asincrónica, generando alteraciones en la concentración del mismo, es importante recalcar que el ciclo de producción y regeneración de veneno es largo, por lo cual las concentraciones y proteínas que van a ser producidas variarán en periodos cortos de tiempo (28).

## 2.2 Serpientes *Micrurus* colombianas.

Dentro del territorio colombiano se encuentran 28 especies (Tabla 2-1) correspondientes al género *Micrurus* y algunas de ellas son endémicas del país (7,8,18). De ellas son pocos los venenos que han sido estudiados en lo referente a su composición bioquímica, siendo estudiadas tan solo 7 especies como lo son: *Micrurus dumerilii*, *Micrurus mipartitus*, *Micrurus dissoleucus*, *Micrurus lemniscatus* y *Micrurus surinamensis* (6,13,14,16,17). En el presente estudio se consideraron las siguientes especies que se distribuyen en el país: *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de las cuales se realizará una breve descripción a continuación.

**Tabla 2-1.** Especies de serpientes *Micrurus* colombianas

#	Especie	Patrón de coloración <sup>1</sup>	Región geográfica
1	<i>M. ancoralis</i>	Triada o terna	Pacífica
2	<i>M. dissoleucus</i>		Atlántica
3	<i>M. filiformis</i>		Amazonía Orinoquía
4	<i>M. hemprichii</i>		Amazonía Orinoquía
5	<i>M. isozonus</i>		Orinoquía
6	<i>M. lemniscatus</i>		Amazonía Orinoquía
7	<i>M. nattereri</i>		Orinoquía

10 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

#	Especie	Patrón de coloración <sup>1</sup>	Región geográfica	
8	<i>M. spixii</i>		Amazonía	Orinoquía
9	<i>M. surinamensis</i>		Amazonía	Orinoquía
10	<i>M. camilae</i>	Mónada	Atlántica	Magdalena medio
11	<i>M. clarki</i>		Pacífica	
12	<i>M. dumerilii</i>		Andina	Pacífica y Atlántica
13	<i>M. langsdorffi</i>		Orinoquía	Amazonía
14	<i>M. medemi</i>		Orinoquía	
15	<i>M. nigrocinctus</i>		Pacífica	
16	<i>M. oligoanellatus</i>		Pacífica	
17	<i>M. ornatissimus</i>		Amazonía	
18	<i>M. putumayensis</i>		Amazonía	
19	<i>M. remotus</i>		Orinoquía	
20	<i>M. sangilensis</i>		Andina	
21	<i>M. tikuna</i>		Amazonía	
22	<i>M. mipartitus</i>	Bicolor	Andina	Pacífica y Atlántica
23	<i>M. multifasciatus</i>		Pacífica	
24	<i>M. multiscutatus</i>		Pacífica	
25	<i>M. spurrelli</i>		Pacífica	
26	<i>M. narducci</i>	<i>Leptomicrurus</i>	Pacífica	Amazonía
27	<i>M. renjifo</i>		Orinoquía	
28	<i>M. scutiventris</i>		Amazonía	Orinoquía

Fuente: Elaboración propia

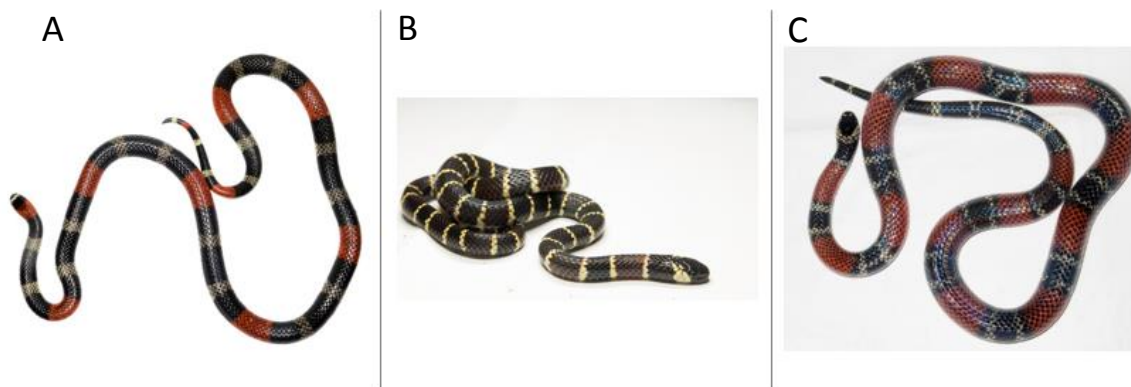
**Tabla 2-1.**<sup>1</sup>Patrón de coloración. En el caso de las serpientes corales, éstas presentan patrones de coloración o secuencias, que de manera general permiten la identificación respecto de las serpientes coral no venenosas (falsas corales), entre ellos se distinguen: mónada (secuencias con un anillo negro, en medio de bandas rojas), triada (secuencia de tres anillos negros, en medio de bandas rojas), bicolor (secuencias de anillos blanco negro), en dónde los anillos o bandas blancas pueden cambiar a color amarillo; finalmente un patrón infrecuente, que son las corales de anillos completos en el vientre e incompletos en el dorso, que corresponden al género *Leptomicrurus*.

### 2.2.1 *Micrurus lemniscatus* LINNAEUS, 1758

Se encuentra distribuida en Colombia en las ecorregiones de la Orinoquía y la Amazonía, reportadas en altitudes no mayores a 1000 msnm. Habitan en bosque húmedo de baja montaña y en tierras bajas, incluyendo su presencia en áreas despejadas, galerías y bosques secundarios, incluso llegando a encontrarse en áreas próximas al perímetro

urbano (8). Se distingue por presentar un patrón de coloración compuesto por triadas de anillos negros (Figura 2-1).

**Figura 2-1.** Especies de *Micrurus* en el presente estudio



Fuente: Juan Pablo Hurtado – Serpentario INS

**Figura 2-1.** A. *M. lemniscatus*, B. *M. medemi* y C. *M. sangilensis*.

### **2.2.2 *Micrurus medemi* ROZE, 1967**

Esta especie se encuentra distribuida en las proximidades del área urbana de Villavicencio, próxima a la base de la cordillera oriental de los Andes, siendo endémica para esta zona, y sobre los 250 a 600 msnm. Debido a su distribución focalizada es conocida popularmente como coral de Villavicencio. Su hábitat se caracteriza por ser de bosque lluvioso de baja montaña (8). Su patrón de coloración se encuentra compuesto por mónadas de anillos negros, en presencia de anillos rojos oscuros. (Figura 2-1)

### **2.2.3 *Micrurus sangilensis* NICEFORO MARÍA, 1942**

Especie endémica del país, distribuida en el norte del país entre las cordilleras central y oriental, en los departamentos de Santander, Boyacá, y norte de Cundinamarca, en altitudes variando entre 1018 y 1737 msnm. Habita en ambientes de bosque tropical seco, bosque seco de baja montaña y bosque seco de baja humedad (8). Presenta un patrón de coloración en mónadas de anillos negros (Figura 2-2).

## 2.3 Características del veneno de serpientes *Micrurus*

El veneno de las serpientes en general, se define como un cóctel o mezcla de moléculas bioactivas, que inmovilizan y digieren sus presas en la adquisición de alimento, así como en estrategias de defensa frente a competidores y predadores naturales (29,30). En el caso de las serpientes corales, el veneno se trata de una combinación de péptidos y proteínas responsables de ejercer el efecto tóxico, algunos de ellos con actividad enzimática mientras otros carecen de esta actividad (30–32)

El veneno producido por las serpientes en cuanto a su cantidad y composición se ve afectado por variaciones epigenéticas entre individuos, especie, sitio de origen e incluso durante los diferentes estadios de desarrollo ontogénicos del individuo, asociadas a cambios filogenéticos, hábitos alimenticios y condiciones ambientales (3,9,13,14,30,33). Se ha reportado de manera general que los venenos contienen 25% de sólidos totales, 70 a 90% de proteínas y polipéptidos, 10 a 30% son sustancias de bajo peso molecular como aminas, carbohidratos, aminoácidos, iones, compuestos inorgánicos (3). Lomonte en 2016 (9) mencionó las principales familias proteicas identificadas por medio de técnicas analíticas. En total 22 familias fueron identificadas y algunas de ellas se mencionan en la Tabla 2-5, siendo las más abundantes y representativas Fosfolipasa A<sub>2</sub> y las toxinas de tres dedos 3FTx.

El veneno de serpientes del género *Micrurus* presenta componentes de carácter neurotóxico, con mayor participación de las proteínas PLA<sub>2</sub> y las 3FTx, como se indicó inicialmente, presentes en todas las serpientes del género. Este carácter dicotómico de las proteínas de los venenos de corales es un elemento clave para la identificación de los principales efectos neurotóxicos y miotóxicos de los venenos de serpientes del género *Micrurus* (6,9,14,15,34).

### 2.3.1 Fosfolipasa A<sub>2</sub> - PLA<sub>2</sub>

Este grupo de proteínas catalizan hidrolisis dependiente de Ca<sup>+2</sup> de glicerofosfolípidos en el enlace acil *sn*-2 liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres (29,35). La amplia

diversidad de PLA<sub>2</sub> como secreciones exocrinas de glándulas, páncreas, glándulas de veneno así como en situaciones de inflamación en los organismos (5), con grandes diferencias en su funcionalidad, han llevado a clasificarlas en 15 grupos incluyendo numerosos subgrupos (36).

La evolución y adaptación de las diferentes familias de serpientes han llevado a que en el caso de los venenos producidos por serpientes del género *Micrurus* van a encontrarse proteínas del grupo I siendo análoga a la fosfolipasa pancreática de los mamíferos (Tabla 2-2) (5), situación contraria para los venenos de Vipéridos en la cual se expresaran PLA<sub>2</sub> del grupo II (5,29).

**Tabla 2-2.** Fosfolipasas del grupo 1 identificadas en elápidos.

PLA grupo 1 (Elápidos)			
Toxina	Especie	Subunidades	MM (kDa) <sup>1</sup>
<b>Notexina</b>	<i>Notechis scutatus</i>	Una PLA <sub>2</sub>	13,6
<b>Ceruleotoxina</b>	<i>Bungarus fasciatus</i>	Dos PLA <sub>2</sub>	30
<b>Taipoxina</b>	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Tres PLA <sub>2</sub>	45,6
<b>Textilotoxina</b>	<i>Pseudonaja textiles</i>	Cinco PLA <sub>2</sub>	80
<b>β-bungarotoxina</b>	<i>Bungarus multicinctus</i>	Una PLA <sub>2</sub> y un inhibidor de proteasa homólogo	20,5

Estructuralmente estos polipéptidos de 13 a 14 kDa (5), en las serpientes presentan una estructura conformada por 3 alfa hélices, un loop de unión al Ca<sup>+2</sup>, dos láminas beta antiparalelas cortas y una región C-terminal; independiente de su sitio catalítico (29).

En el caso de las neurotoxinas de elápidos pueden distinguirse tres tipos de acuerdo a su estructura molecular: β-neurotoxinas de cadena sencilla (x ej: Notexina), β-neurotoxinas de cadena múltiple (x ej: Textilotoxina, Taipoxina) y β-bungarotoxinas (5,35). En el caso de las β-neurotoxinas de cadena sencilla, éstas ejercen su actividad enzimática por si misma a diferencia de β-neurotoxinas de cadena múltiple y de las β-bungarotoxinas que pueden estar conformadas por dos o más unidades polipeptídicas. Estas enzimas se caracterizan

<sup>1</sup>MM (kDa): hace referencia a la masa molecular de cada toxina expresado en unidades de kilodaltons.

porque no se encuentran unidas por puentes disulfuro y presentan homología con PLA<sub>2</sub> acorde a la especie de serpiente ( $\beta$ -neurotoxinas de cadena múltiple) o están conformados por la asociación covalente de dos polipéptidos muy diferentes unidos por puentes disulfuro siendo la segunda subunidad un homólogo de inhibidores de proteinasas o dendrotoxinas ( $\beta$ -Bungarotoxinas) (Tabla 2-2)(5). De estas subunidades por lo menos una de ellas es enzimáticamente activa, las demás pueden o no serlo, sin embargo la presencia de estas subunidades pueden potenciar el efecto de la otra, actuando como chaperonas que ayudan en la unión específica de la enzima PLA<sub>2</sub> al sitio presináptico (5,35).

Las neurotoxinas con actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> presentes en el veneno de elápidos, son potentes inductores de parálisis por medio del bloqueo de la placa neuromuscular y constituyen uno de los principales grupos enzimáticos del veneno de serpientes corales, siendo capaces de generar variados efectos tóxicos sinérgicamente con otros componentes del veneno o de manera independiente, estando identificados neurotoxicidad, cardiotoxicidad, miotoxicidad, actividad hemolítica, actividad inductora de hemoglobinuria, hemorragias internas, edema, convulsiones, hiperalgesia, inflamación, hipotensión, hemolisis, daño directo a órganos (Hígado, riñón, pulmones, testículos, y glándula pituitaria), alteraciones en la coagulación y en la agregación plaquetaria (29,30,35); sin embargo, no todos los efectos van a ser producidos por todas las PLA<sub>2</sub>, exhibiendo cada enzima un efecto específico (35).

Se ha demostrado que las neurotoxinas del tipo PLA<sub>2</sub> inducen exocitosis de vesículas sinápticas posterior de la producción de lisofosfolípidos y ácidos grasos, así como una afluencia sostenida de Ca<sup>+2</sup> del medio intracelular a las terminales nerviosas, debido a modificaciones inducidas en la membrana de las mitocondrias, facilitando apertura de poros de transición, aumentando su permeabilidad, este efecto ha sido descrito en neuronas motoras de la médula espinal y neuronas granulares del cerebelo (37). Este mecanismo de acción de tipo presináptico, no afecta el cuerpo celular ni el axón de la neurona motora, lo que permite una recuperación completa en la mayoría de los pacientes (37).



### 2.3.2 Toxinas de tres dedos (3FTx)

Estas toxinas son estructuras polipeptídicas no enzimáticas, conformadas por 60 a 74 residuos de aminoácidos y constituyen uno de los principales componentes de los venenos de Elápidos. (29). Estructuralmente, las 3FTxs tienen tres bucles conformados por láminas beta que se extienden desde un pequeño núcleo hidrofóbico globular que está unido por cuatro puentes disulfuro conservados (29,38).

Son varios los efectos farmacológicos que han sido identificados por parte de estas toxinas, como neurotoxicidad (principal efecto del veneno de corales), citotoxicidad, cardiotoxicidad, entre otros. Es importante mencionar que la actividad biológica de estas toxinas (tabla 2-3) varía dependiendo de la afinidad que se tenga por receptores o células de forma inespecífica (31,39,40).

Dentro de las neurotoxinas de las 3FTx, dependiendo de la secuencia de aminoácidos, estas pueden ser clasificadas en dos tipos: tipo I neurotoxinas de cadena corta y tipo II neurotoxinas de cadena larga, con una masa molecular que varía entre los 6 y 9 kDa (38,40). Las  $\alpha$  neurotoxinas de cadena corta han sido identificadas como las principales responsables del efecto neurotóxico de estos venenos, debido a unión de alta afinidad al receptor nACh, así como bloqueo sobre el receptor sin afectar liberación de neurotransmisores de forma presináptica, este tipo de toxinas, sin embargo, no son las únicas involucradas en la neurotoxicidad. (30,31,41).

**Tabla 2-3.** Toxinas de tres dedos (3FTx) identificadas en elápidos (31,39,40).

Tipo de 3FTx		Mecanismo de Acción	Ejemplo
Neurotoxinas	A	Antagonismo sobre nAChR $\alpha 1$ y/o $\alpha 7$ .	$\alpha$ -bungarotoxinas
	$\kappa$	Reconocen distintos subtipos de nAChRs neuronales $\alpha 3\beta 4$	$\kappa$ -bungarotoxinas.
	Muscarínicas	Unión selectiva a mAChRs.	MT1 de <i>Dendroaspis angusticeps</i>
Cardiotoxinas		Forman poros iónicos en las membranas lipídicas.	Cardiotoxin V4II de <i>Naja mossambica</i>

16 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

Tipo de 3FTx	Mecanismo de Acción	Ejemplo
<b>β -Cardiotoxinas y similares</b>	Unión a receptores adrenérgicos β1 y β2.	CTX9, CTX14, CTX15, CTX21 y CTX23 de <i>Ophiophagus hannah</i>
<b>No convencionales</b>	Neurotoxinas débiles, afinidad nanomolar a AChR α1 y α7	Candoxina
<b>Inhibidores de acetilcolinesterasa</b>	Unión a la acetilcolinesterasa	Fasciculinas
<b>Bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L.</b>	Bloqueo de canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L en musculo esquelético y cardiaco	Calciseptina
<b>Inhibidores de la agregación plaquetaria</b>	Interfiere con la interacción entre fibrinógeno y el receptor de glicoproteína IIB–IIIa (α <sub>IIb</sub> β3).	Dendroaspina
<b>Otras 3FTx</b>	Aún no han sido muy bien caracterizadas funcionalmente.	Algunas toxinas <i>angusticeps</i> .
<b>Proteínas huérfanas</b>	Función no determinada.	α-colubritoxina

### 2.3.3 Otros grupos peptídicos y proteicos presentes en el veneno.

Como se ha mencionado anteriormente, el veneno de las serpientes es una matriz compleja de varios compuestos proteicos y no proteicos, responsables de ejercer el efecto sobre su organismo blanco (presa o predador). En el caso de los venenos de especies de los elápidos han sido descritos diferentes componentes, entre los cuales se destacan los mencionados en la tabla 2-4.

**Tabla 2-4.** Otros componentes peptídicos y proteicos en el veneno de elápidos

Componente	Masa Molecular	Mecanismo de acción	Efecto	Referencia
<b>Metaloproteasas</b>	20-110 kDa	Degrada membrana basal celular del endotelio capilar (laminina, nidógeno, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos), activación de protrombina o	Hemorragia local y/o sistémica por disrupción del endotelio vascular, alteración de la coagulación, mionecrosis, hipovolemia e inflamación.	Xiong S y Huang C, 2018 (29)

Componente	Masa Molecular	Mecanismo de acción	Efecto	Referencia
		factor X en la cascada de coagulación e inhibición plaquetaria.		
<b>Lectinas tipo C</b>	9-30 kDa	Poseen dominio de reconocimiento de carbohidratos, interactúan con el factor de Von Willebrand o con receptores específicos tales como la glicoproteína Ib (GPIb), $\alpha 2\beta 1$ o la glicoproteína VI (GPVI) en las plaquetas.	Aglutinar in vitro glóbulos rojos, agregación plaquetaria, actividad coagulante y anticoagulante.	Pereañez J y Vargas L, 2009 (42) Palomino M, et al, 2012 (43)
<b>Toxinas tipo Kunitz</b>	<10k Da	Inhibidor de Proteasas	Inhibidor de proteasas, bloqueo de los canales iónicos, alteraciones en la coagulación sanguínea, fibrinólisis e inflamación.	Boldrini-França Johara, et al., 2017. (44). Masci P, et al., 2009 (45)
<b>Hialuronidasas</b>	28 a 70 KDa  33 a 110 kDa <sup>2</sup>	Hidrolisis del hialuronato en oligosacáridos y N-acetilglucosamina, es significativo.	Altera las propiedades estructurales, reológicas y químicas de la matriz celular, actuando como factor de dispersión del veneno.	Boldrini-França Johara, et al., 2017. (44). Fox Jay W, 2013. (46).
<b>L-AAO (L amino oxidasas)</b>	120 KDa <sup>3</sup>	La actividad de la L-amino oxidasas de las proteínas da como resultado la producción de peróxido de	Citotoxicidad, apoptosis, alteración de agregación plaquetaria, edema, bactericida, antiparasitaria	Fox Jay W, 2013. (46).

<sup>2</sup>Sugiriendo una heterogeneidad estructural debida a una modificación postraducciona; truncamiento de transcripciones o caracterización defectuosa.

<sup>3</sup> Obtenido en electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

18 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

Componente	Masa Molecular	Mecanismo de acción	Efecto	Referencia
		hidrógeno con la producción de radicales libres de oxígeno y da como resultado un estrés oxidativo.		
<b>EXONUCLEASAS</b>			Papel en la generación de nucleósidos de purina, podría estar involucrado en la relajación del músculo liso y la vasodilatación, así como otros efectos sobre la función cardiovascular. Biodistribución de toxina e inmovilización de presa. Aumenta la permeabilidad vascular, inhibe la liberación y los neurotransmisores. Potencia, sedación, locomotora de depresión y bradicardia.	
<b>Fosfodiesteras</b>	98-149KDa	Hidrolizar los enlaces fosfodiéster secuencialmente del extremo 3' de los polinucleótidos que producen mononucleótidos		Boldrini-França Johara, et al., 2017.(44); Fox Jay W, 2013.(46).
<b>ENDONUCLEASAS</b>				
<b>DNAasas</b>	15 KDa	Escisión en adenosinas del ADN y ARN.		Boldrini-França Johara, et al., 2017.(44); Fox Jay W, 2013.(46).
<b>RNAasas</b>	15 KDa	Escisión en adenosinas del ADN y ARN.		Boldrini-França Johara, et al., 2017.(44); Fox Jay W, 2013.(46).
<b>Serineproteinasas</b>	26 a 67 KDa	La que son similares a trombina convierten el fibrinógeno en coágulos de fibrina, liberando los fibrinopéptidos A y B de las cadenas AK y BL del	Afectan la coagulación sanguínea, agregación plaquetaria, fibrinólisis, el sistema del complemento y el sistema inmunitario	Serrano Solange M T, 2013. (47).

Componente	Masa Molecular	Mecanismo de acción	Efecto	Referencia
		fibrinógeno, respectivamente. Además, participan en la estimulación de la coagulación sanguínea al activar los factores V, VIII y XIII (y posiblemente los factores VII y XI), estimulan la fibrinólisis y activa la agregación plaquetaria.		Xiong S y Huang C, 2018 (29)
<b>Péptidos antibacteriales</b>	2,49kDa	Los péptidos antimicrobianos se encuentran en varios organismos y forman parte de su sistema inmune innato, participan de la defensa del huésped y contribuyen a la supervivencia de estos organismos en ambientes ricos en microbios.	Los péptidos antimicrobianos se encuentran en varios organismos y forman parte de su sistema inmune innato, participan de la defensa del huésped y contribuyen a la supervivencia de estos organismos en ambientes ricos en microbios.	Boldrini-França Johara, et al., 2017. (44).
<b>PLB-Fosfolipasa B</b>	16,5 kDa, proteína madura 60 kDa	La escisión se produce en las posiciones sn1 y sn2	Escisión de fosfolípidos de membrana y actividad hemolítica.	Boldrini-França Johara, et al., 2017. (44).

En el caso de venenos de las especies del género *Micrurus*, han logrado identificarse una gran variedad de compuestos como puede verse en la **tabla 2-5** (9–11), siendo PLA2 y 3FTx constante en todos los venenos, los demás componentes pueden o no estar presentes y varían de acuerdo a la especie.

**Tabla 2-5.** Componentes proteicos identificados en especies del género *Micrurus*

Famili a Protéi ca <sup>1</sup>	Especies de <i>Micrurus</i> <sup>2</sup>																	
	All(48)	alt(49)	cla(22)	cor(49)	dum <sup>3</sup> (16)	fro (50)	ful (51)	ibi (50)	lem (50)	mip <sup>3</sup> (15)	mos (48)	nig (34)	pyr(10)	rua(11)	spi (50)	sur (52)	ten(53)	tsc(54)
3FTx	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
PLA <sub>2</sub>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
svMIP	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*		
CTL	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*	*	*	*			
SP			*	*	*					*	*	*	*	*				
Kun		*	*		*					*	*		*	*		*	*	*
LAO	*	*	*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*		*
ACh										*			*					
FGN	*										*		*					
GPx	*		*										*	*				
Vesp	*											*	*	*				
Oha	*											*		*				

Famili a Protéi ca <sup>1</sup>	Especies de <i>Micrurus</i> <sup>2</sup>																	
	All(48)	alt(49)	cla(22)	cor(49)	dum <sup>3</sup> (16)	fro (50)	ful (51)	ibi (50)	lem (50)	mip <sup>3</sup> (15)	mos (48)	nig (34)	pyr(10)	rua(11)	spi (50)	sur (52)	ten(53)	tsc(54)
PLB			*		*													
Hya	*				*													
PDE	*				*		*				*			*				
Nuc					*						*	*		*				
Lip		*											*					
VEGF													*					
CRISP		*											*					
Wap													*					
Rib	*																	
GMN											*							
MTx												*						
PNP	*				*						*							

22 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

Famili a Protéi ca <sup>1</sup>	Especies de <i>Micrurus</i> <sup>2</sup>																	
	All(48)	alt(49)	cla(22)	cor(49)	dum <sup>3</sup> (16)	fro (50)	ful (51)	ibi (50)	lem (50)	mip <sup>3</sup> (15)	mos (48)	nig (34)	pyr(10)	rua(11)	spi (50)	sur (52)	ten(53)	tsc(54)
UNK	*		*								*			*				

**Tabla 2-5.**<sup>1</sup>Abreviaturas: 3FTx: toxinas de tres dedos, PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>, svMP: metaloproteasas, CTL: Lectina tipo C, SP: serin proteasas, Kun: inhibidores tipo Kunitz, LAO: L amino ácido oxidasas, ACh: acetilcolinesterasas, NGF: factor de crecimiento de nervio, GPx: glutatión peroxidasa, Vesp: Similar a Vesprina; Oha: similares a ohanina, PLB: fosfolipasa b, Hya: hialuronidasa, PDE: fosfodiesterasa, Nuc: nucleotidasa, Lip: lipasas, VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, CRISP: proteínas secretorias ricas en cisteína, Wap: Waprina; Rib: proteína ribosomal, GMN: glicoproteína de membrana neuronal , MTx: toxinas muscarínicas, PNP: péptidos y componentes no proteínicos, UNK: sin identificar.

<sup>2</sup>Especies: all: *M. alleni*; alt: *M. altirostris*; cla: *M. clarki*; cor: *M. corallinus*; dum: *M. dumerilii*; fro: *M. frontalis*; ful: *M. fulvus*; ibi: *M. ibiboboca*; lem: *M. lemniscatus*; mip: *M. mipartitus*; mos: *M. mosquitensis*; nig: *M. nigrocinctus*; pyr: *M. pyrrhocryptus*; rua: *M. ruatanus*; spi: *M. spixii*; sur: *M. surinamensis*, ten: *M. tener*, tsc: *M. tschudii*.

3. Especies de *Micrurus* colombianas.

## 2.4 Caracterización bioquímica del veneno de *Micrurus*

Los venenos de serpientes contienen componentes peptídicos, proteicos y no proteicos que están implicados en actividades de alimentación y defensa, pero a los que se les ha encontrado gran potencial biotecnológico y médico (25). Es por esto que la caracterización del proteoma del veneno de serpientes (la venómica), por un lado brinda un amplio campo dentro de la investigación básica, diagnóstico clínico del accidente ofídico, mejoramiento de protocolos de inmunización y estrategias de producción de antiveneno que permitan obtener una mayor especificidad y efectividad, así como también brinda la posibilidad de desarrollar nuevas moléculas y fármacos con potencial uso clínico y genera nuevas herramientas para comprender mecanismos evolutivos de los venenos así como de sus actividades biológicas (25).

Existen varios abordajes implicados en la caracterización bioquímica de los venenos de serpientes, entre los que se incluyen análisis por RP-HPLC, fraccionamiento del veneno



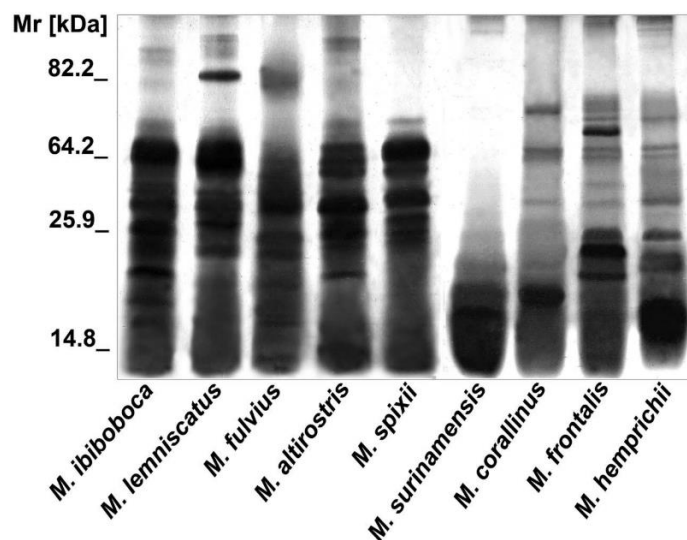
crudo por RP-HPLC, SDS-PAGE, espectrometría de masas (25). En el presente proyecto se realizó una caracterización bioquímica parcial mediante técnicas de separación como electroforesis SDS-PAGE, RP-HPLC y electroforesis bidimensional.

### 2.4.1 Estado del arte

Son pocos los estudios que muestran un perfil electroforético del veneno completo de serpientes perteneciente al género *Micrurus*, encontrando en la mayoría de los casos electroforesis relacionadas a la extracción y purificación de fracciones de veneno, de los cuales de los venenos de serpientes del país tan solo han sido estudiados dos ellos mediante un enfoque proteómico (14–16).

La Figura 2-2, muestra uno de los estudios en los cuales se analizó el perfil electroforético de varios venenos de *Micrurus* en SDS-PAGE a un gradiente de 7,5 a 15%, los venenos fueron provistos por el Instituto Butantan en Brasil, el estudio permitió determinar que habían variaciones en la composición y número de bandas para cada uno de los venenos, con masas moleculares en la mayoría de los casos inferiores a 64kDa, a excepción de *M. surinamensis* que presenta bandas en valores menores (19).

**Figura 2-2.** Perfil electroforético de especies de *Micrurus*

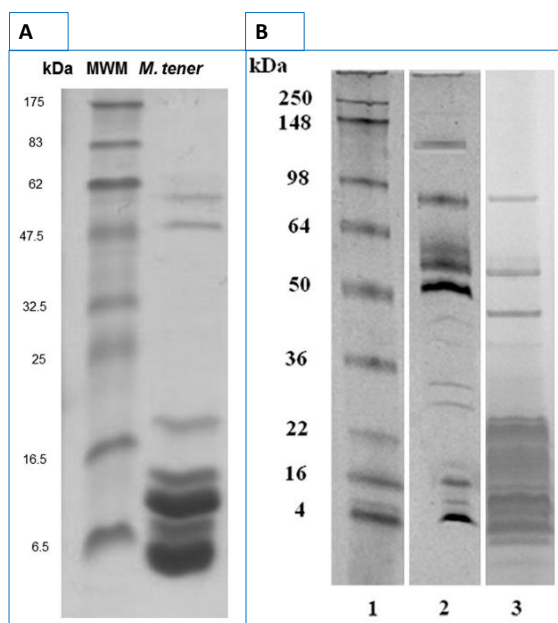


Fuente: Tomada de Tanaka et al, 2010 (19)

**Figura 2-2.** Gel de electroforesis SDS-poliacrilamida en gradiente (7,5- 15%), se usaron 20µg de cada veneno.

Han sido realizados también estudios con *Micrurus tener* (Figura 2-3), por un lado, en el primero se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 17% en condiciones reductoras con 10 mg de veneno completo de *M. tener* encontrando bandas intensas entre 5 y 18 kDa. Además, se pueden observar dos bandas débiles cerca de los marcadores de proteína 47.5 y 60 kDa (53). Por otro lado, un estudio diferente desarrollado la misma serpiente analizó veneno completo mediante SDS-PAGE en un gradiente de 10 a 20% (Figura 2-3). En condiciones no reducidas y reducidas, en el que encontraron 17 bandas (dos entre 45 y 55 kDa, una entre 34 y 45 kDa, 12 bandas entre 18 y 7 kDa y dos entre 4 y 7 kDa)(55). Es evidente que los venenos en ambos casos comparten elementos similares, a pesar de las diferentes concentraciones empleadas en la preparación de los geles.

**Figura 2-3.** Perfil electroforético de *Micrurus tener*

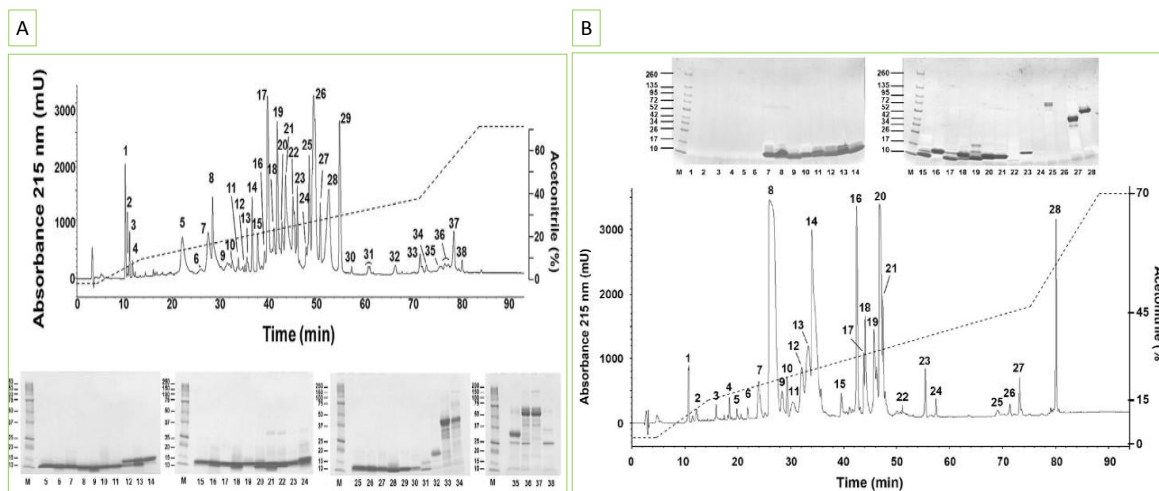


Fuente: Tomada de Bénard-Valle et al, 2014(53) y Salazar et al, 2011(55).

**Figura 2-3.** El panel **A** muestra el perfil electroforético de veneno completo de *M. tener* SDS-PAGE (17%) en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol, se emplearon 10µg de proteína (53). El panel **B** gel SDS-PAGE 10-20% de veneno completo de *M. tener* (50µg). Carriles: 1. marcador de peso molecular; 2. Gel en condiciones no reductoras; 3. Gel en condiciones reductoras (55).

Los venenos del país que han sido ampliamente estudiados, probablemente debido a su importancia dentro de la salud pública al ser las especies de mayor accidentalidad en el país son *Micrurus dumerilii* y *M. mipartitus* (Figura 2-4) (2). La metodología usada en los estudios mencionados será tomada como guía para la caracterización de los venenos de *M. lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis*,

**Figura 2-4.** Cromatografía y perfiles electroforéticos de *Micrurus dumerilii* y *M. mipartitus*.

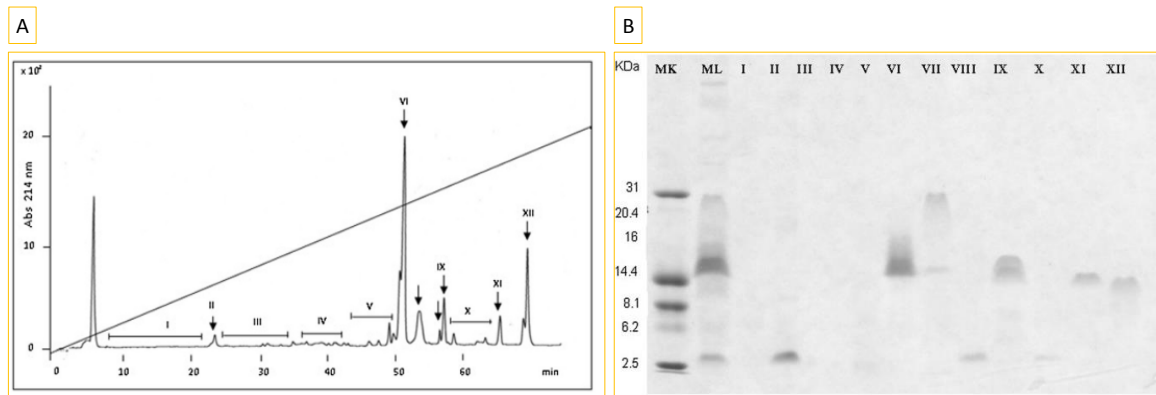


Fuente: Tomado de Paola Rey-Suarez (15,16).

**Figura 2-4.** Las imágenes muestran la separación por RP-HPLC del veneno completo, seguida de electroforesis del veneno y de cada una de las fracciones, la figura A muestra el análisis del veneno de *Micrurus dumerilii* (16) y la figura B el análisis obtenido para el veneno de *Micrurus mipartitus* (15).

De los tres venenos de *Micrurus* en estudio, el veneno de *Micrurus lemniscatus* es el único que cuenta con estudios relacionados a su composición y actividad farmacológica (Figura 2-5). Encontrando dos estudios enfocados en el aislamiento de PLA<sub>2</sub> presente en su veneno (56,57), cabe aclarar que la metodología descrita para la separación cromatográfica es diferente a la propuesta y que el veneno proviene del estado de Bahía de Brasil, por lo tanto es importante recalcar que aunque se cuentan con un referente los venenos pueden presentar variaciones intraespecíficas, asociadas a cambios en su ecosistema, dieta y ontogenia como pudo evidenciarse en el estudio realizado por Paola Rey-Suarez en 2011, en el caso de la especie *Micrurus mipartitus* (15).

**Figura 2-5.** Perfil Electroforético y cromatográfico de *Micrurus lemniscatus*



Fuente: Figuras tomadas de Casais-E-Silva Luciana, 2016 (56).

**Figura2-5.** A. Se presenta el perfil cromatográfico de *M. lemniscatus*. B. se encuentra electroforesis del veneno completo de *M. lemniscatus* y cada una de las fracciones aisladas en la cromatografía de la Figura2-5 A.

En el caso de los venenos de *Micrurus medemi* y *M. sangilensis*, no se encontró ningún reporte referente a la caracterización bioquímica de sus venenos, por lo cual este estudio será el primero en mostrar una caracterización bioquímica parcial del veneno completo.

## 2.5 Desarrollo metodológico

### 2.5.1 Obtención del veneno.

- Muestra

Se emplearon venenos liofilizados de *Micrurus medemi* de la región Orinoquía, *M. sangilensis* de la región Andina y *M. lemniscatus* de la región Amazónica de Colombia (Tabla 2-6 y Figura 2-8) procedentes del Banco de Venenos del INS; el veneno liofilizado fue almacenado a temperaturas inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su conservación, de acuerdo a los estándares establecidos por la OMS (58) y el Banco de Venenos de la Dirección de Producción del INS.

- Consideraciones éticas.

La realización del trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional para su desarrollo. Ver Anexo A.

De igual manera el INS tiene estandarizadas y validadas las pruebas biológicas con animales de laboratorio, esta documentación es know how y están debidamente avaladas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales en el Instituto Nacional de Salud -CICUAL-INS, creado mediante la resolución interna No.0052 de 2018. Este comité, se encarga de vigilar y regular los procesos que incluyan uso de animales, con el fin que sean realizados bajo los estándares éticos internacionales

El presente estudio no requiere permiso de acceso a recurso genético, como quiera que es una investigación básica de caracterización y sin fines comerciales, sin embargo, el INS cuenta con contrato marco de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados N° 253 de 2019

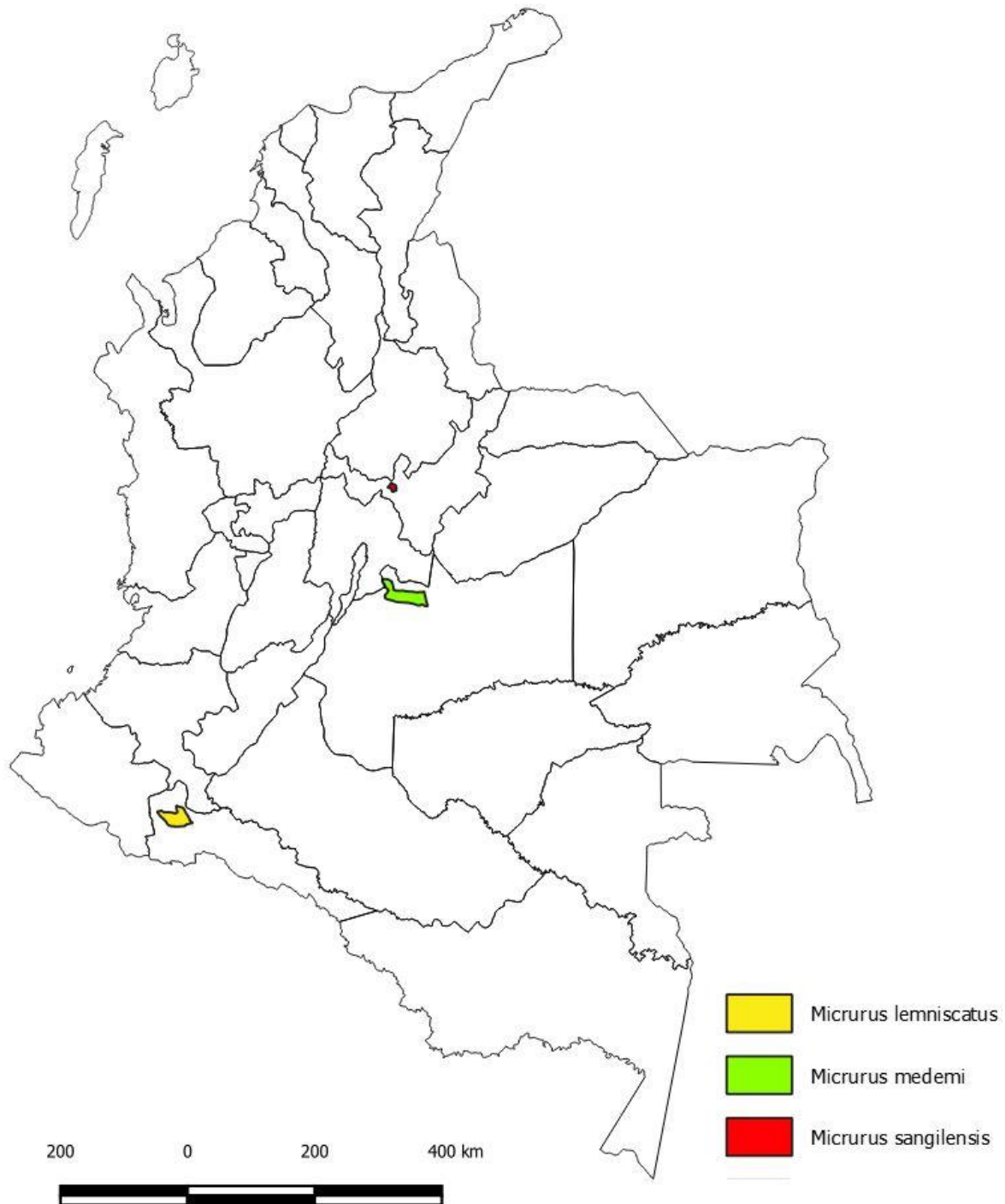
**Tabla 2-6.** Venenos empleados en el estudio

Especie	Zona geográfica	Localidad de procedencia	n (número de individuos)	Lote
<i>M. lemniscatus</i>	Amazonía	Villagarzón - Putumayo	3	218345A008P
<i>M. medemi</i>	Orinoquía	Villavicencio – Meta	4	216234A035P
<i>M. sangilensis</i>	Andina	Sutamarchan-Boyacá	1	218243A061P

- Transporte del veneno.

El veneno liofilizado de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis*, fue entregado por el personal responsable del Banco de Venenos de la Dirección de Producción del INS, este fue transportado desde las instalaciones del INS al laboratorio del Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP), a una temperatura menor a -20°C en nevera de Icopor, acorde a lineamientos del Banco de Venenos del INS, así como al anexo 5 de la guía para la producción, control y regulación de las inmunoglobulinas de antiveneno de serpiente de la OMS (58).

**Figura 2-6.** Ubicación geográfica serpientes *Micrurus*.



**Figura 2-6.** Ubicación geográfica serpientes *Micrurus*. *M. lemniscatus*: Villagarzón-Putumayo (Color amarillo). *M. medemi*: Villavicencio-Meta (Color verde). *M. sangilensis*: Sutamarchan-Boyacá (Color rojo).

- Preparación e identificación de los venenos

Cada uno de los venenos fueron separados en tres fracciones, una de ellas disuelta en las siguientes soluciones PBS-1x, agua grado HPLC y agua TFA 0,1%, posteriormente los venenos se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos, separando el sobrenadante para posteriormente analizarlo.

Los tres venenos fueron identificados acorde a la especie y a la solución empleada para disolverlos (PBS-1X, agua grado HPLC, agua TFA 0,1%) (Tabla 2-7).

**Tabla 2-7.** Identificación de venenos.

Veneno	Solvente		
	PBS-1X	Agua grado HPLC	Agua TFA 0,1%
<i>M. lemniscatus</i>	ML1	ML2	ML3
<i>M. medemi</i>	Mm1	Mm2	Mm3
<i>M. sangilensis</i>	Ms1	Ms2	Ms3

## 2.5.2 Cuantificación de proteína total en el veneno.

La cuantificación de proteína soluble total del veneno de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis* se realizó acorde a la metodología del ácido bicinonínico (BCA), estandarizado por Smith en 1985 (59) y adaptado por el laboratorio del Grupo de Investigación en Proteínas - GRIP. Como patrón se empleó albúmina sérica bovina (BSA) 1mg/mL, se realizaron diluciones en serie (ANEXO B), sembrando en microplacas y realizando lectura de absorbancia a 540nm, realizando el mismo procedimiento con cada uno de los venenos.

## 2.5.3 Identificación del perfil peptídico y proteico del veneno de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis*.

- Electroforesis SDS-PAGE

Se desarrolló con veneno completo en condiciones no reductoras sobre geles de SDS-PAGE-tris-glicina de acuerdo a la metodología establecida por Laemmli (60) con una solución de acrilamida al 50% a una concentración de 12,5% y en geles de SDS-PAGE-

tris-tricina acorde al método de Shagger y Von Jageer (61) a diferentes concentraciones 10% y 15%, empleando cámara electroforética BIO-RAD Mini Protean®, y usando 25mg de cada uno de los venenos. Los geles fueron teñidos con solución coomassie blue G-250 (62) y/o tinción de plata (63); el análisis de los geles se realizó por medio del programa ImageLab 5.2.1 de Bio Rad.

- Cromatografía líquida de alta eficiencia.

Se realizó una separación en columna semi-preparativa Chromolith RP-18 100-10mm en el cromatógrafo Chromaster VWR Hitachi acoplado a detector UV CM5410 (Anexo C), siguiendo la metodología planteada por Rey-Suarez en 2011 (15), usando cromatógrafo con detector UV a 215 nm. La elución se hizo a un flujo de 3 mL/min desde la solución A (Ácido trifluoroacético, TFA 0,1%; en agua grado HPLC) a la solución B (0,1 % de TFA; en acetonitrilo, ACN), aplicando el siguiente gradiente 5% de solución B por 5 minutos, 5-15% de solución B por 10 minutos, 15-45% de solución B por 60 minutos y 45-70% de solución B por 12 minutos (14–16).

- Electroforesis bidimensional

Para ello fue necesario realizar precipitación de las proteínas presentes en el veneno (250 µg de proteína total de veneno completo), el cual posteriormente fue disuelto en buffer muestra (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2 % Anfolitos 3-10, DTT 40 mM).

Se rehidrató la tira IPG (IPG's de un rango continuo de pH 3-10 y 7 cm de diámetro, BIO-RAD) de forma pasiva durante 2 horas a temperatura ambiente con 125 µL de solución de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, anfolitos Bio-Lyte 3/10 0,2 % w/v y trazas azul de bromo fenol), finalizada la rehidratación pasiva se agrega 1 mL de aceite mineral, continuando con la rehidratación activa por 11 horas. Después de la rehidratación, se realizó el enfoque usando Bio-Rad PROTEAN® IEF cell a una temperatura de 20 °C a 250 V por 20 min, 4000 V por 2 horas y finalmente 4000 V a 10000 V-hr, todo a 50 µA/tira para un total de 5 horas.



Una vez terminada la primera dimensión, se realiza el equilibrio de las tiras IPG incubando 20 minutos en agitación con Buffer de equilibrio I (urea 6 M, SDS 2 %, Glicerol 20 % y Tris-HCl ,375 M pH 8,8 y DTT 130 mM), seguido de Buffer de equilibrio II (Urea 6 M, SDS 2 %, Glicerol 20 % y Tris-HCl ,375 M pH 8,8 y iodoacetamida 135 mM) durante 20 minutos en agitación y oscuridad. Una vez finalizado el equilibrio de las tiras IPG la segunda dimensión se llevó a cabo en SDS-PAGE usando geles del 12,5 % (86). Al finalizar la separación en la segunda dimensión los geles se tiñeron con tinción de plata. El análisis de los geles se realizó con el software PDQuest de BIO RAD.

## 2.6 Resultados

### 2.6.1 Cuantificación de proteína

Los tres venenos de serpientes del género *Micrurus* fueron evaluados por el método de BCA, se encontraron diferencias en la concentración de proteína total del veneno crudo (Tabla 2-8), siendo el veneno de la especie *M. lemniscatus* el que presenta mayor concentración en ambos solventes (PBS-1X y Agua grado HPLC), en el caso de la especie *M. sangilensis* se encontró el menor contenido proteico en solución PBS-1X.

**Tabla 2-8.** Cuantificación de proteína total presente en los venenos de trabajo

Identificación	Peso liofilizado (mg)	VT	Volumen de resuspensión (mL)	Concentración de veneno liofilizado (mg/mL)	Concentración de proteína- BCA (mg/mL)	Porcentaje de proteína (%)
ML1	2,000		2,000	1,000	0,741	71,100
ML2	3,000		2,000	1,500	1,137	75,800
ML3	1,000		0,500	2,000	0,806	40,300
Mm1	2,500		2,000	1,250	0,672	53,760
Mm2	2,500		2,000	1,250	0,660	52,800
Mm3	1,000		0,500	2,000	0,608	30,400
Ms1	5,000		5,000	1,000	0,320	32,000
Ms2	1,000		1,000	1,000	0,309	30,900
Ms3	1,000		0,500	2,000	0,819	40,950

## 2.6.2 Electroforesis SDS-PAGE

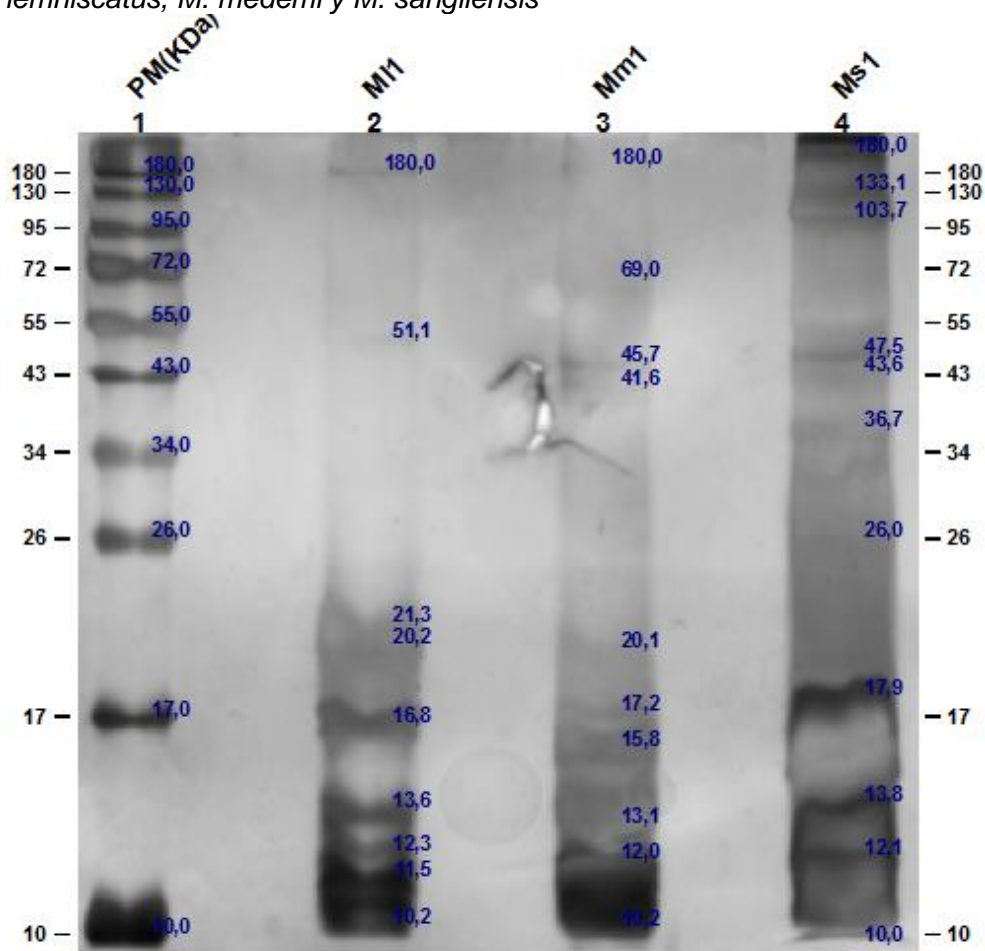
La electroforesis SDS-PAGE en geles de tris-glicina al 12,5%, permitieron identificar diferencias claras entre los tres venenos estudiados encontrando dos grupos de bandas, el primer grupo conformado por bandas en masas moleculares entre 26 y 180 kDa y un segundo grupo para masas moleculares de pesos bajos menores a 26 kDa (Figura 2-7 y Tabla 2-9).

**Tabla 2-9.** Distribución de bandas en gel SDS-PAGE-Tris-glicina 12,5%

Veneno	MI1 (kDa)	Mm1 (kDa)	Ms1 (kDa)
<b>Bandas &lt; 26 kDa</b>	10,2 11,5 12,3 16,8 20,2 y 21,3	10,2 12 13,1 15,8 17,2 y 20,1	10 12,1 13,8 y 17,9
<b>Bandas ≥ 26 kDa</b>	51,1 y 180	41,6 45,7 69 y 180	26 36,7 43,6 47,5 103,7 133,1 y 180
<b>Número total de bandas</b>	8	10	11

**Tabla 2-9.** Con base al método de LaemmLi en gel de 12,5%. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 3.2.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 3.2.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 3.2.1). A partir del análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

**Figura 2-7.** Electroforesis Laemmli SDS-PAGE Tris-glicina 12,5% de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis*



**Figura2-7.** Con base al método de Laemmli en gel de 12,5% 25 mg de cada uno de los venenos. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). Análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

Las bandas obtenidas en el gel muestran notables diferencias entre los venenos de las 3 especies, en el caso de ML1 se puede observar una menor proporción de bandas asociadas a componentes de altas masas moleculares con respecto a los venenos Mm1 y Ms1 (Figura 3-6), siendo en el caso del veneno Ms1 el que presenta mayor número de bandas en esos rangos.

A pesar de las notorias diferencias encontradas en la Figura 2-7, los venenos presentaron elementos que migraron a la misma distancia en el gel de SDS-PAGE-tris glicina 12,5%,

34 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

como puede verse en la Tabla 2-10, indicativo de que comparten estos elementos. Adicionalmente, puede observarse que los venenos ML1 y Mm1, presentaron una banda intensa entre los 10 y 12 kDa, banda ausente en Ms1.

**Tabla 2-10.** Bandas con migración similar en gel SDS-PAGE-Tris-glicina 12,5%

ML1 (kDa)	Mm1 (kDa)	Ms1 (kDa)
10,2	10,2	10
12, 3	12	12,1
16,8	17,2	17,9
51,1	45,7	47,5
180	180	180

**Tabla 2-10.** Con base al método de Laemmli en gel de 12,5%. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). A partir del análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

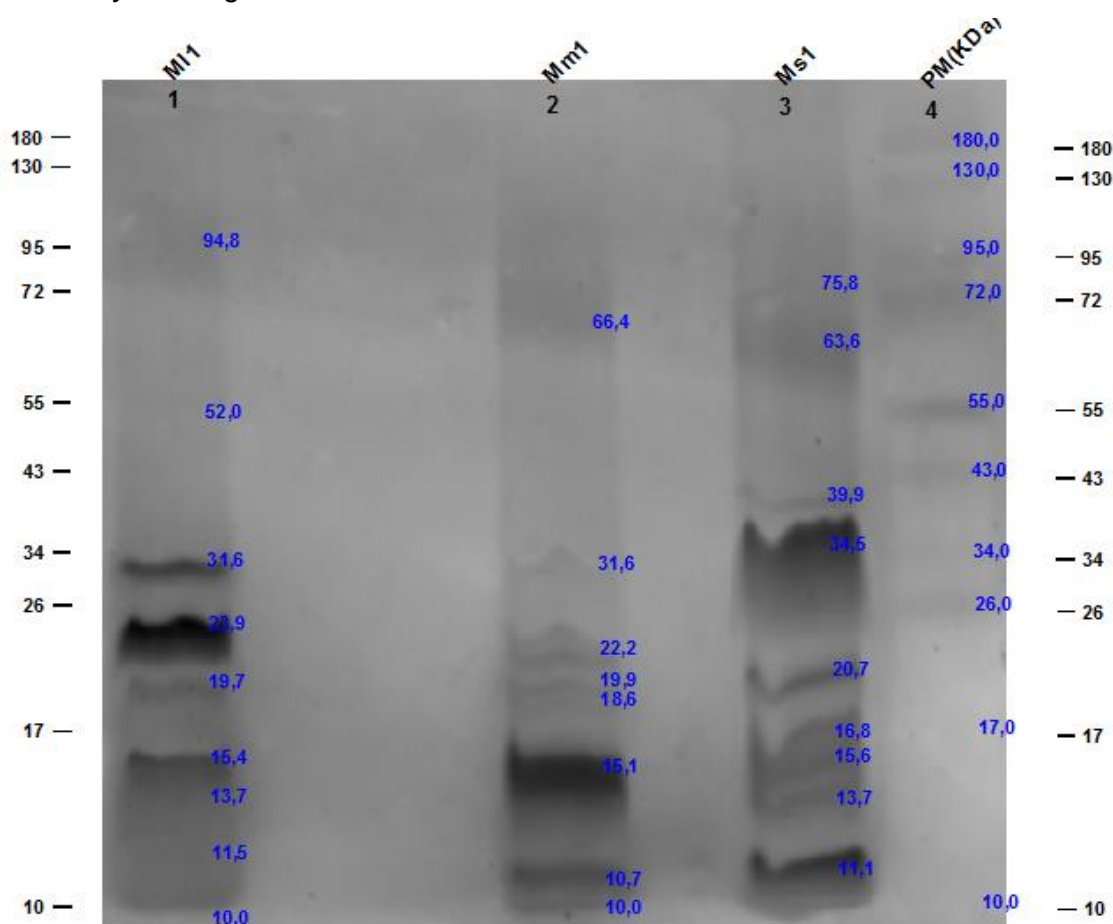
La presencia de múltiples bandas en pesos moleculares bajos y la poca resolución de algunas bandas en la electroforesis SDS-PAGE-tris-glicina (Figura 2-7), motivaron la realización de electroforesis SDS-PAGE-tris-tricina 10% y 15%, observando una mayor resolución del gel con una concentración del 15% (Figura 2-8), obteniendo las bandas que se listan en la Tabla 2-11.

**Tabla 2-11.** Bandas obtenidas en gel SDS-PAGE-Tris-tricina 15%

VENENOS	ML1 (kDa)					Mm1 (kDa)					Ms1 (kDa)				
<b>Bandas Identificadas</b>	10	11,5	13,7	16,4	19,7	10	10,7	15,1	18,6	19,9	11,1	13,7	15,6	16,8	20,7
	23,9	31,6	52	y 94,8		22,2	31,6	y 66,4			34,5	39,9	63,6	y 75,8	
<b>Número total de bandas</b>	9					8					9				

**Tabla 2-11.** Con base al método de Shagger and von Jagow en gel de 15%. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). A partir del análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

**Figura 2-8.** Electroforesis SDS-PAGE Tris-tricina 15% de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis*



**Figura 2-8.** Gel tris-tricina 15% 25 mg de cada uno de los venenos. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). Análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

La separación en el gel SDS-PAGE-Tris-Tricina 15%, corrobora las diferencias encontradas entre los venenos en el gel de SDS-PAGE-Tris-glicina 12,5%, se observan variaciones en el número y distribución de bandas, entre ellas se destacan la presencia de una banda de mayor intensidad en los 23,9 kDa para ML1, en el caso de Mm1 la banda de mayor intensidad se encontró ubicada a los 15 kDa y para Ms1 se encontraron dos bandas entre los 34,6kDa y 11,1 kDa.

De igual manera que en la Figura 2-7 y la tabla 2-11, es posible identificar patrones de migración similar en la **Figura 2-8** (Tabla 2-12)

**Tabla 2-12.** Bandas con patrón de migración similar en gel SDS-PAGE-Tris-Tricina 15%

ML1 (kDa)	Mm1 (kDa)	Ms1 (kDa)
11,5	10,7	11,1
16,4	15,1	15,6
19,7	19,8	20,7
31,6	31,6	34

**Tabla 2-12.** Con base al método de Shagger and von Jagow en gel de 15%. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). A partir del análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad

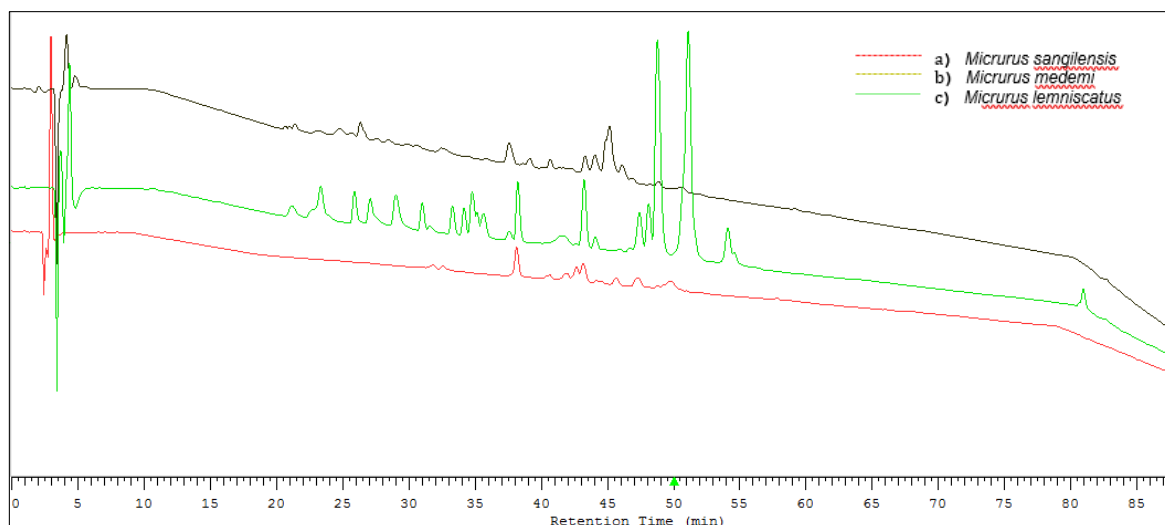
### 2.6.3 Resultados Cromatografía por RP-HPLC

En este estudio se emplearon 3 muestras de venenos del género *Micrurus*, disueltos en agua -TFA 0,1% se realizó comparación entre los cromatogramas (**Figura 2-9**), cada uno de los cromatogramas individuales se encuentran en el Anexo D, las fracciones obtenidas en cada cromatografía fueron recolectadas de forma manual y los tiempos de retención también son reportados (**Tabla 2-13**). Las proteínas se detectaron a una longitud de onda de 215 nm, no se estimaron las abundancias relativas.

Se observa que el número de señales y la intensidad de estas es variable en cada uno de los venenos, indicativo de las diferencias proteicas y peptídicas presentes en los venenos, todos los venenos empezaron a presentar señales 20 minutos después de iniciado el método.

El veneno de *Micrurus lemniscatus* fue el que presentó señales de una mayor intensidad en un tiempo de retención de 48,7 y 51 minutos, en el caso de *Micrurus medemi* la señal se detectó a los 45,2 minutos de transcurrido el método y para *M. sangilensis* en un tiempo de retención de 38 minutos. Sin embargo, ninguna de las señales de *M. medemi* y *M. sangilensis* presentaron una intensidad tan marcada como *M. lemniscatus*.

**Figura 2-9.** Cromatograma múltiple HPLC-RP C<sub>18</sub> de cada uno de los venenos de *Micrurus*



**Figura 2-9.** Cromatograma múltiple de los venenos de *Micrurus* usando el software Chromaster Sys1. En la imagen de abajo hacia arriba se identifican: a. *Micrurus sangilensis*, b. *Micrurus medemi* y c. *Micrurus lemniscatus*. Venenos disueltos en Agua-TFA 0,1% descrito en 2.5.1.

Los cromatogramas de los tres venenos mostraron una mayor intensidad en un tiempo de retención entre los 35 y 55 minutos, presentando únicamente el veneno de *M lemniscatus* una señal a los 80,9 minutos, asociados a elementos de menor polaridad.

**Tabla 2-13.** Tiempos de retención para las fracciones obtenidas en los venenos de *Micrurus*

Fracción	ML3	Mm3	Ms3
1	21,2	20,7	20,7
2	23,4	21,0	21,5
3	25,9	21,4	25,0
4	27,1	23,2	29,3
5	29,0	24,0	31,0
6	31,0	24,8	31,8
7	31,6	25,7	32,6
8	33,3	26,4	38,1
9	34,2	27,6	40,4
10	34,8	28,5	40,7
11	35,2	29,9	41,8
12	35,6	30,6	42,0

Fracción	ML3	Mm3	Ms3
13	37,6	32,5	42,7
14	38,2	34,5	43,2
15	39,7	35,8	44,2
16	41,5	37,6	45,7
17	42,6	38,6	47,3
18	43,3	39,1	48,0
19	44,1	40,2	48,8
20	45,9	40,7	49,3
21	46,7	41,4	49,7
22	47,4	41,7	51,0
23	48,1	42,2	57,8
24	48,8	43,3	58,7
25	51,1	44,1	66,0
26	52,9	44,9	67,9
27	54,1	45,2	
28	54,6	46,1	
29	80,9	46,9	
30		48,2	
31		48,9	
32		49,8	
33		50,5	

**Tabla 2-13.** Fracciones obtenidas mediante HPLC-RP C18. ML3: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm3: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms3: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). A partir del análisis con el Software Chromaster Sys.1. Los colores identifican fracciones con tiempos de retención similares.

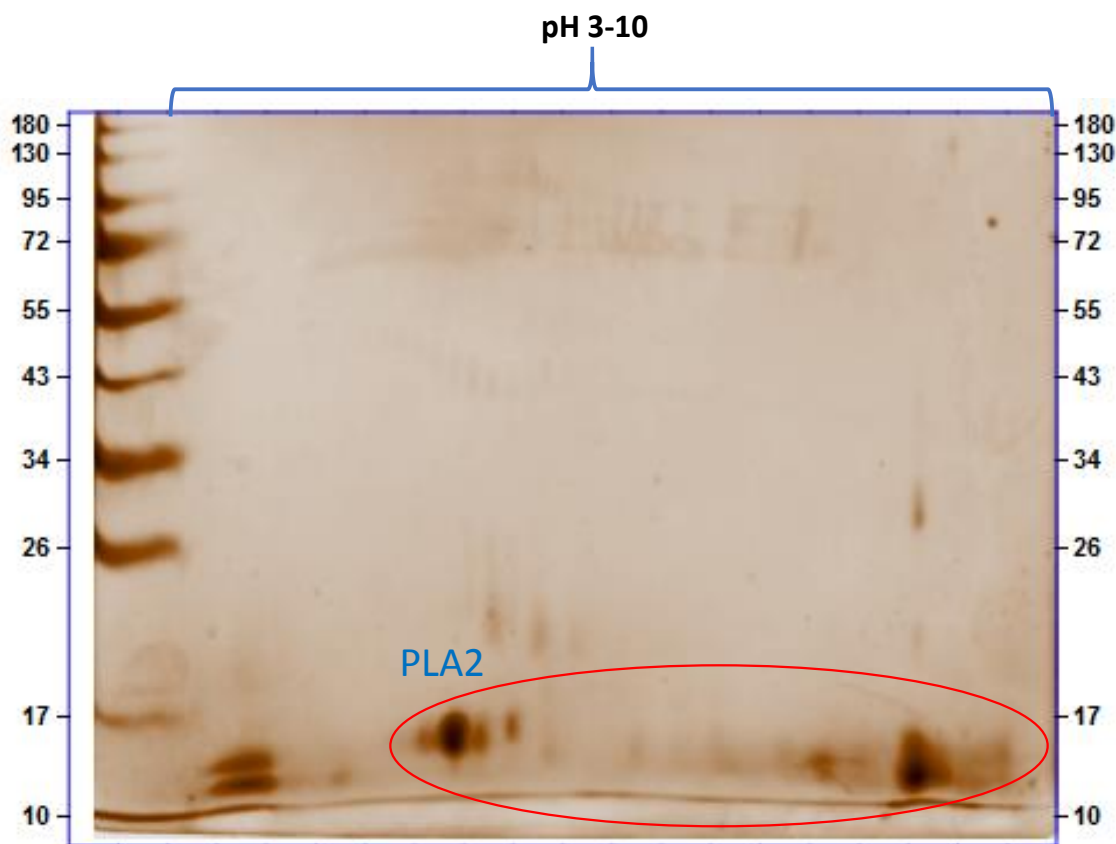
## 2.6.4 Resultados Electroforesis bidimensional

De acuerdo a los resultados obtenidos para el veneno de *M. lemniscatus*, se observan varios grupos de proteínas, uno de ellos las proteínas entre 72 a 95 kDa en un PI aproximado entre 5 y 8, las proteínas cercanas a los 43 kDa en un PI en el intervalo de 5 y 6 y spots de mayor intensidad en masas moleculares menores a 25 kDa que se encuentran en un PI en el intervalo de 3 a 9,5 (Figura 2-10). De acuerdo a lo reportado por otros autores (Vergara et al, 2014) con veneno de *M. fulvius* (51), podríamos presumir



que el veneno posee un gran componente que se corresponde a PLA2. El reporte de las masas moleculares y puntos isoeléctricos de cada spot se encuentran en el Anexo E.

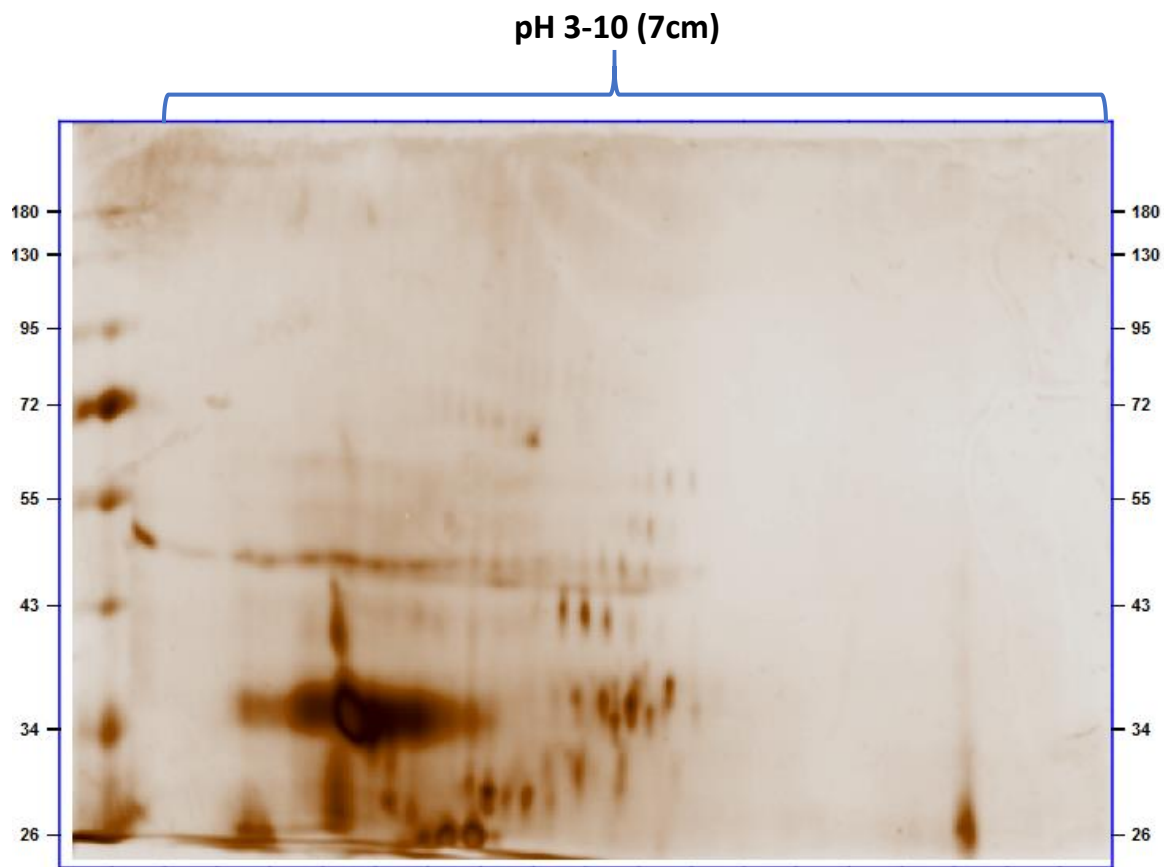
**Figura 2-10.** Electroforesis bidimensional *Micrurus lemniscatus*



**Figura 2-10.** Mapa protéico del veneno de *M lemniscatus* (250 $\mu$ g), 2D-SDS-PAGE usando un rango de pH de 3 a 10 (tira 7 cm) en el isoelectroenfoco y SDS-PAGE 12,5% en la segunda dimensión. El análisis fue realizado con PDQuest Advanced.

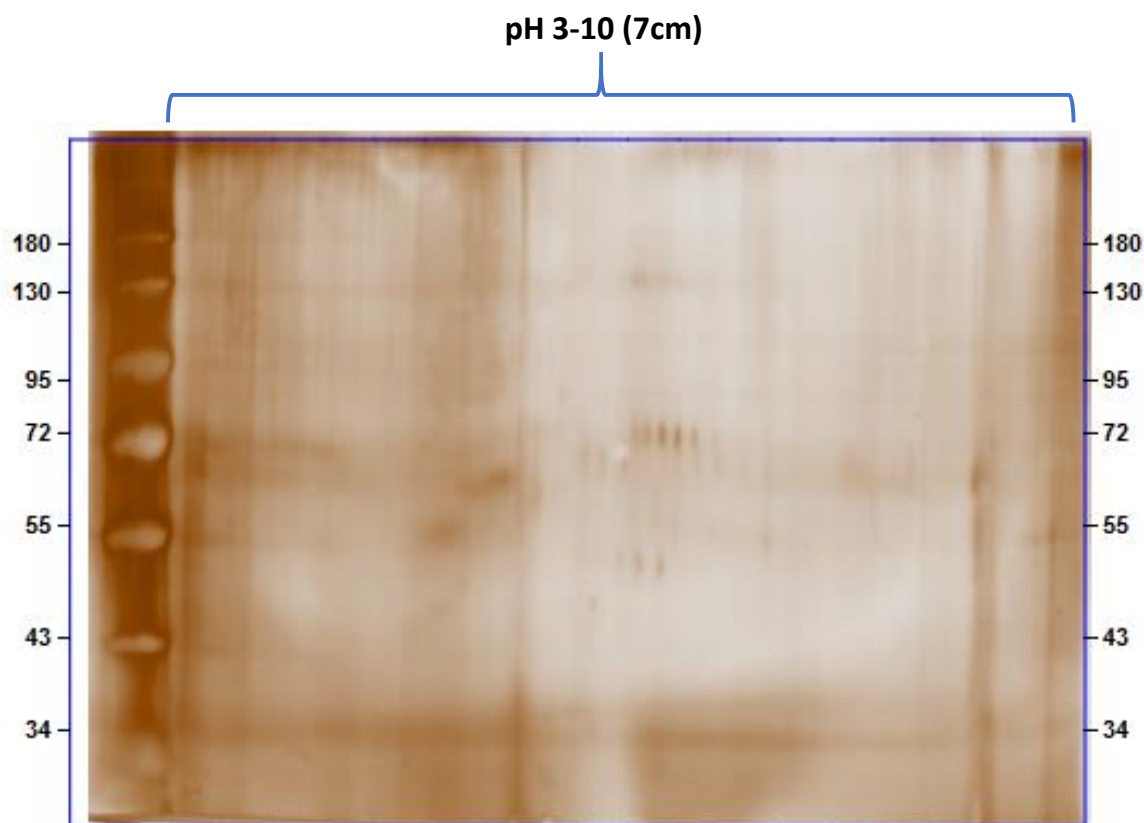
El veneno de *M. medemi*, se observan varios grupos de proteínas, presenta spots en pesos menores a 72kDa, en un PI aproximado entre 3 y 7, el spot de mayor intensidad se encuentra en los 34 kDa y un punto isoeléctrico entre 4 y 5(Figura 2-11). El reporte de las masas moleculares y puntos isoeléctricos de cada spot se encuentran en el Anexo E.

**Figura 2-11.** Electroforesis bidimensional *Micrurus medemi*



**Figura 2-11.** Mapa protéico del veneno de *M. medemi* (250 $\mu$ g), 2D-SDS-PAGE usando un rango de pH de 3 a 10 (tira 7 cm) en el isoelectroenfoque y SDS-PAGE 12,5% en la segunda dimensión. El análisis fue realizado con PDQuest Advanced.

**Figura 2-12.** Electroforesis bidimensional *M. sangilensis*



**Figura 2-12.** Mapa protéico del veneno de *M. sangilensis* (250µg), 2D-SDS-PAGE usando un rango de pH de 3 a 10 (tira 7 cm) en el isoelectroenfoque y SDS-PAGE 12,5% en la segunda dimensión. El análisis fue realizado con PDQuest Advanced.

El veneno de *M. sangilensis*, se observan spots entre los 72 y 55 kDa, en un PI aproximado entre 5 y 7,5, a diferencia de los otros geles no se observaron spots en menores masas moleculares (Figura 2-12).

## 2.7 Discusión

El estudio de los componentes de péptidos y proteínas de los venenos de especies del género *Micrurus* es muy escaso respecto a estudios relacionados al veneno de vipéridos, esto sustentado en la dificultad existente en la captura y mantenimiento de estas especies en cautiverio, sumado a la poca cantidad producida en cada proceso de ordeño (9,13). Por lo cual, el estudio de estos venenos presenta un amplio campo de estudio desde la toxinología y la bioquímica, para caracterización de sus componentes.

Las diferencias en los resultados de las cuantificaciones de proteína pueden estar asociadas a las concentraciones preparadas para cada una de las muestras previo a su análisis mediante la metodología de BCA. Sin embargo, es de esperarse que la concentración de las muestras de veneno presente variaciones intra e interespecíficas(9,13,15,48,53).

Se prepararon diferentes concentraciones para cada uno de los venenos debido a dificultad para el pesaje de los mismos; el primer veneno en ser disuelto fue el de *Micrurus sangilensis* empleando una concentración de 1 mg/mL, obteniendo en la cuantificación un valor de por debajo de 0,5mg/mL; debido a esto se trataron de fraccionar las muestras de los otros dos venenos en 2 alícuotas de 2,5 mg de veneno para ser disueltas en 2mL de cada una de los solventes, sin embargo el veneno de *Micrurus lemniscatus*, presentó estática y no fue posible obtener alícuotas del mismo peso. Las variaciones obtenidas entre la cuantificación realizada por el método de ácido bicinconínico y las concentraciones a las cuales fue preparado el veneno, para cada uno de ellos respectivamente, están relacionadas a la presencia de componentes no peptídicos ni proteicos propios del veneno. Como se mencionó anteriormente se sabe que el veneno de serpiente está compuesto en un 70 a 90% por proteínas y péptidos y en una baja proporción 10 a 30% por sustancias como aminas, carbohidratos, iones y compuestos inorgánicos (3), este porcentaje de componentes no peptídicos pareciera cambiar en los tres venenos de estudio, en el caso de *M. sangilensis* pareciera existir una mayor participación de estos componentes en su veneno.

El uso del método cromatográfico y electroforético seleccionado se basa en la consideración las condiciones de corrida establecidas en estudios previos para especies de serpientes colectadas en Colombia *Micrurus dumerilii* (14,16) y *Micrurus mipartitus* (13–15); el método seleccionado no difiere mucho de lo señalado a lo planteado por otros autores para estudio de venenos (11,22,48,64).

Se observan diferencias en los perfiles electroforéticos en cuanto composición, número e intensidad de bandas en los venenos de *Micrurus* del presente trabajo, de acuerdo a lo reportado por varios autores en cuanto a las diferencias interespecies que pueden

presentarse en estos venenos (9,14,17,30,48,65), junto con la gran variedad de individuos, condiciones biológicas y procesos evolutivos que se presentan en el continente (3,8,18,27).

A partir del gel de SDS-PAGE-tris-glicina fue posible identificar componentes de alta masa molecular en los tres venenos de estudio, siendo mayor el número de estos elementos en el veneno de *M. sangilensis*, presentando 7 bandas en un intervalo entre 26 y 180 kDa, en el caso de *M medemi* fueron encontradas cuatro y para *M lemniscatus* tan solo dos bandas. Estos componentes de acuerdo a revisiones de literatura podrían corresponder a hialuronidasas, L-amino oxidasas, fosfodiesterasas, proteínas secretoras ricas en cisteína, PLB (44,46).

Al comparar los venenos entre sí, es posible afirmar que comparten elementos, asociados en su gran mayoría a componentes de baja masa molecular (Tabla 2-10 y Tabla 1-12), estos componentes pueden estar relacionados a la presencia de 3FTx en los venenos, las cuales pueden encontrarse entre los 6 y 9 kDa (38,40). Esto a su vez puede ser comparado con estudios desarrollados por Cassais E Silva (56), Bénard-Valle (53), Rey-Suárez (14–16), Fernández (34,48), Lomonte (22), Corrêa-Netto (49), Lippa (11), Sanz (66), en los cuales es posible observar fracciones de veneno correspondientes a 3FTx que poseen componentes cuya migración electroforética es similar a la encontrada en este estudio.

En el caso particular del veneno de *M. lemniscatus*, puede verse que la lemnitoxina la cual es un tipo de PLA2 posee una masa molecular alrededor de los 14,4 kDa (56), por lo que podría corresponder en el gel de SDS-PAGE-Tris-tricina a la banda ubicada en los 13,7 kDa (Figura 2-10).

El método cromatográfico empleado y el tipo de cromatografía usada RP-HPLC, fueron seleccionados debido a que este permite realizar una recuperación de todos los componentes del veneno en el intervalo de masa molecular de 7 a 150 kDa. Adicionalmente, la parte inicial del gradiente de acetonitrilo de la cromatografía de fase inversa resuelve péptidos y proteínas pequeñas (0,4–7 kDa), que no se observarían en una electroforesis bidimensional (64,67).

Los cromatogramas de los 3 venenos mostraron variaciones significativas, en cuanto al número de picos obtenidos y su intensidad, siendo el veneno de *M. lemniscatus* el que presenta un mayor número de señales respecto a los venenos de *M. medemi* y *M. sangilensis*, esto puede atribuirse a variaciones entre especies (9) como se ha visto en los estudios desarrollados por diversos autores al comparar venenos de *Micrurus* usando el mismo método de separación cromatográfica (14,48,49,65).

Se observa que los venenos estudiados en este trabajo, presentan compuestos de alta polaridad las cuales podrían corresponder a péptidos de bajo peso molecular y nucleótidos en el rango de tiempo de 0 a 20 minutos; en el rango de 25 a 40 minutos a pequeñas proteínas como inhibidores de tipo Kunitz, desintegrinas y toxinas de tres dedos; en el rango de tiempo de 40 a 65 minutos, proteínas de tamaño medio como PLA<sub>2</sub>, CTL, SP, CRISP, NGF y VEGF; y entre 65 minutos y 88 minutos a proteínas grandes o más hidrofóbicas como lo son svMP, LAO, PDE, Nucleotidasas, Hialuronidasas y PLB (68).

Por lo anterior, se podría llegar a pensar que estos tres venenos en concordancia con el número de picos y el área obtenida hacen parte de un fenotipo dominante para PLA<sub>2</sub> respecto a 3FTx, sin embargo, es necesario una caracterización más detallada de cada una de las fracciones obtenidas que nos permitan corroborar esta hipótesis.

## 3. Caracterización enzimática.

### 3.1 Estado del arte

#### 3.1.1 Actividad PLA<sub>2</sub>.

Como se mencionó anteriormente estas proteínas catalizan hidrolisis dependiente de Ca<sup>+2</sup> de glicerofosfolípidos en el enlace acil *sn*-2, para una mayor descripción de la actividad y características de esta enzima estas se encuentran descritas en la sección 2.3.1.

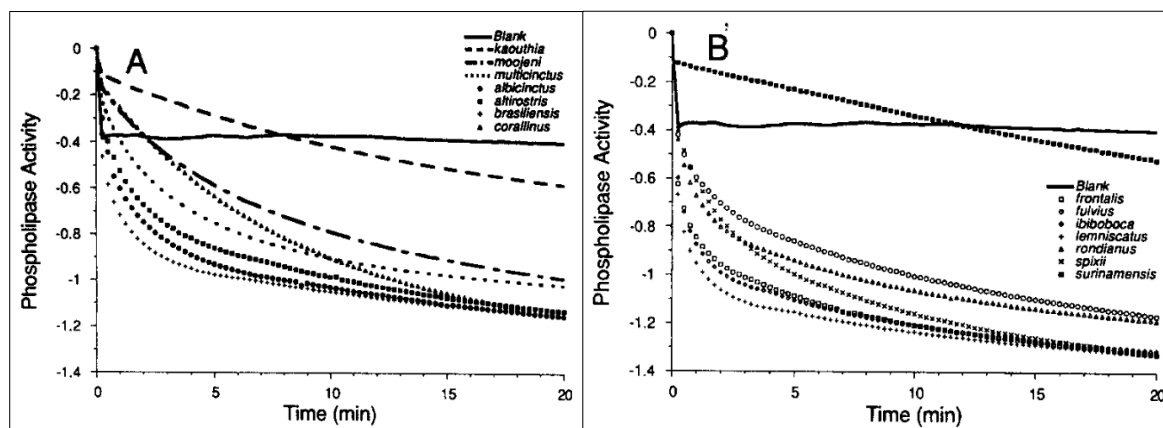
A continuación, en la Tabla 3-1 se listan las especies de *Micrurus* con determinación de la actividad enzimática PLA<sub>2</sub> en su veneno.

**Tabla 3-1.** Especies de *Micrurus* con determinación de actividad fosfolipasa

Especie	Referencia	Especie	Referencia
<i>M. albicinctus</i>	(69)	<i>M. ibiboboca</i>	(19,69)
<i>M. alleni</i>	(48)	<i>M. lemniscatus</i>	(19,33,56,57,69)
<i>M. altirostris</i>	(19,69)	<i>M. mipartitus</i>	(14,15)
<i>M. brasiliensis</i>	(69)	<i>M. mosquitensis</i>	(48)
<i>M. clarki</i>	(22)	<i>M. nigrocinctus</i>	(33)
<i>M. corallinus</i>	(19,69)	<i>M. pyrrhocryptus</i>	(10)
<i>M. corallinus- M. frontalis</i>	(19)	<i>M. rondonianus</i>	(69)
<i>M. dumerilii</i>	(14)	<i>M. ruatanus</i>	(11)
<i>M. frontalis</i>	(19,33,69)	<i>M. spixii</i>	(19,69)
<i>M. fulvius</i>	(19,51)	<i>M. surinamensis</i>	(19,33,69)
<i>M. hemprichii</i>	(19)	<i>M. tener</i>	(30,53)
<i>M. tener</i>	(30,53)		

Los estudios en su gran mayoría fueron realizados por Aird en 1991 (69), Tanaka en 2010 (19) y Cecchini (2005), con venenos de especies de Brasil y Costa Rica, los cuales muestran diferencias en su actividad, como puede verse en la Figura 3-1.

**Figura 3-1.** Actividad PLA<sub>2</sub> de veneno de serpientes del género *Micrurus* (69)



Fuente: Tomada de Aird S y Da Silva N, 1991.

**Figura 3-1.** Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> en venenos de especies de *Micrurus* de Brasil, el sustrato empleado fue fosfatidilcolina, se emplearon 5µl de cada veneno (2µg/µl) y lectura de absorbancia a 558nm.

Para el veneno de *M. lemniscatus*, en el trabajo de Aird (69), se comprobó que el veneno completo de *M. lemniscatus* se encontraba dentro de los venenos con mayor actividad enzimática, resultado similar a los datos obtenidos por Tanaka en 2010 (19). Sin embargo, el estudio realizado por Cecchini (33) mostró que la actividad PLA<sub>2</sub> del veneno de *M. lemniscatus* (38,5±3,5 U/mg) era menor que la actividad para los venenos de *Micrurus frontalis* y *Micrurus nigrocinctus* (89,9±2,1 y 75.3±1.9 respectivamente)(33).

En lo referente a fracciones de veneno completo de *M. lemniscatus*, el estudio desarrollado por Casais e Silva(56), determino que la actividad enzimática del veneno completo de *M. lemniscatus* era de 300 µmoles/mg/min, para la lemnitoxina la cual es una PLA<sub>2</sub> la actividad enzimática fue menor con un valor de 120µmoles/mg/min. En el caso particular del estudio realizado por Oliveira (57), de fracciones obtenidas a partir de RP-HPLC del veneno completo de *M. lemniscatus* (MLx-8 MLx-9, MLx-11 y MLx-12), se encontró que estas poseían una alta actividad específica de fosfolipasa A<sub>2</sub>, siendo mayor el valor reportado para las fracciones en comparación al veneno completo, lo cual difiere de lo reportado por Casais e Silva.



### 3.1.2 Actividad hialuronidasa.

La enzima hialuronidasa se conoce como un "factor de dispersión", para los venenos de serpientes porque facilita la difusión de toxinas en los tejidos, lo cual puede mejorar el efecto del veneno sobre la presa (17,44,46).

Su participación en el proteoma del veneno de serpientes del género *Micrurus* no es constante, encontrándose reportada en pocas especies como *Micrurus alleni* (48) y *Micrurus dumerilii* (16) ( Ver **Tabla 2-5**), probablemente al tratarse de un componente muy representativo de este veneno. Sin embargo, son bastantes los estudios que contemplan la determinación de su actividad enzimática. (**Tabla 3-2**).

**Tabla 3-2.** Especies de *Micrurus* con determinación de actividad enzimática

Especie	Actividad enzimática	Referencia
<i>M. albicinctus</i>	PRESENTE	(17,69)
<i>M. altirostris</i>	BAJA <sup>1</sup>	(17,19,69)
<i>M. baliocoryphus</i>	BAJA	(17)
<i>M. brasiliensis</i>	AUSENTE	(17,69)
<i>M. corallinus</i>	PRESENTE <sup>2</sup>	(17,19,69)
<i>M. corallinus</i> - <i>M. frontalis</i>	PRESENTE	(19)
<i>M. frontalis</i>	BAJA <sup>1</sup>	(17,19,69)
<i>M. fulvius</i>	BAJA <sup>2</sup>	(17,19,51)
<i>M. hemprichii</i>	AUSENTE <sup>1</sup>	(17,19)
<i>M. ibiboboca</i>	PRESENTE	(17,19,69)
<i>M. lemniscatus</i>	AUSENTE <sup>3</sup>	(17,19,69)
<i>M. nigrocinctus</i>	AUSENTE	(17)
<i>M. pyrrhocryptus</i>	AUSENTE	(17)
<i>M. rondonianus</i>	AUSENTE	(69)
<i>M. spixii</i>	AUSENTE <sup>1</sup>	(17,19,69)
<i>M. surinamensis</i>	MUY BAJA <sup>1</sup>	(17,19,69)

**Tabla 3-2.** <sup>1</sup>Según el estudio realizado por Tanaka en 2010 (19), para esta misma especie se reportó una actividad alta. <sup>2</sup>El estudio realizado por Da Silva en 2001(17), para esta especie no reporto actividad. <sup>3</sup>En el caso del estudio realizado por Tanaka en 2010(19), para esta misma especie se reportó una actividad alta.

La presencia de esta enzima es muy variable en los venenos de *Micrurus*, expresándose con baja actividad o ausencia en presencia del ácido hialurónico, especialmente en los venenos de *M. baliocoryphus* y *M. brasiliensis*, una situación opuesta es la de los venenos

de *M. albicinctus* y *M. ibiboboca* los cuales la actividad enzimática siempre estuvo presente. Venenos de serpientes como *M. altirostris*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. fulvius*, *M. hemprichii*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* y *M. surinamensis* el comportamiento es variable presentándose ausencia o no ausencia de la actividad enzimática (**Tabla 3-2**).

Dentro de los reportes de literatura encontrados ninguno realiza determinación de la actividad mediante zymograma, metodología adoptada en el presente trabajo. Los reportes determinan esta actividad mediante el método turbidométrico (17,19,51,69) a partir de ácido hialurónico.

### 3.1.3 Actividad Proteasa

La actividad proteasa fue mínima en los venenos de *Micrurus*, probados con sustratos sintéticos y naturales teñidos, de acuerdo a lo determinado por Aird en 1991(69), los sustratos Azocaseína, azoalbumina y azocoll fueron exiguamente hidrolizados por estos venenos. También fue determinada a partir de Azocaseína en veneno de *Micrurus dumerilii*. Sin embargo, en los venenos evaluados se presentaron fluctuaciones entre los diferentes sustratos empleados.

Ninguno de los ensayos encontrados, realizaron un abordaje mediante el uso de zimogramas a partir de geles copolimerizados con caseína o gelatina. Metodología abordada en este trabajo.

**Tabla 3-3.** Venenos del género *Micrurus* con caracterización de la actividad proteasa

Especie	Referencia	Especie	Referencia
<i>M. albicinctus</i>	(17,69)	<i>M. hemprichii</i>	(17,19)
<i>M. altirostris</i>	(17,19,69)	<i>M. ibiboboca</i>	(17,19,69)
<i>M. bailocoryphus</i>	(17)	<i>M. lemniscatus</i>	(17,19,69)
<i>M. brasiliensis</i>	(17,69)	<i>M. mipartitus</i>	(16)
<i>M. corallinus</i>	(17,19,69)	<i>M. pyrrhocryptus</i>	(17)
<i>M. corallinus- M. frontalis</i>	(19)	<i>M. rondonianus</i>	(69)
<i>M. dumerilii</i>	(16)	<i>M. spixii</i>	(17,19,69)
<i>M. frontalis</i>	(17,19,69)	<i>M. surinamensis</i>	(17,19,69)
<i>M. fulvius</i>	(17,19,69)		

## 3.2 Desarrollo metodológico

### 3.2.1 Actividad PLA<sub>2</sub> cualitativo.

Se preparó una solución de yema de huevo al 10 % (p/v) en Tris-HCl 0,1 M pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y Tritón X-100 0,5 % con agitación magnética durante 10 minutos, posteriormente fue centrifugada a 1500 rpm 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Luego, se disolvió 0,1 g de agarosa en 10 mL de Tris-HCl 0,2 M pH 7.95 y se adicionó inmediatamente 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM, 7 mL rodamina 6G 0,1 %, 100 µL Tritón X-100 y 2 mL de la solución de yema de huevo al 10 %, dejando solidificar en la caja de petri. Solidificada la solución se realizan pozos circulares para poder sembrar las muestras.

Se sembraron 5 µg de cada veneno de *Micrurus* por pozo, como control positivo, se usó el veneno de *Crotalus durissus* de diferentes regiones de Colombia (Atlántica, Andina y Orinoquía) 5 µg y control negativo PBS 1X pH 7.4 y veneno de *Pterois volitans* 5 µg. Luego se incubó 1 hora a 37 °C. La actividad de fosfolipasa se visualizó en transiluminador UV, por formación de halos traslúcidos o turbios.

### 3.2.2 Actividad PLA<sub>2</sub> cuantitativo.

La actividad de la fosfolipasa del veneno crudo de *Micrurus*, se determinó usando el método colorimétrico establecido por Araujo en 1987 (70) con modificaciones (71), tal como se describe a continuación. Se disolvieron 0,6g de lecitina en 1 mL de etanol a 45°C, seguido de 0,86 mL de Triton X-100, 8mL de NaCl (0,1 M), 4 mL de rojo fenol (5,5 mM), 1,6 mL de CaCl<sub>2</sub> (1M) y completando con 16,6 mL H<sub>2</sub>O destilada. Se realizó un ajuste del pH de la solución agregando una gota de NaOH 2M.

Se sembraron en placas de 96 pozos, diferentes concentraciones de veneno en un intervalo comprendido entre 0 y 0,66 µg/µL; agregando en cada pozo 100µl del sustrato anteriormente descrito. Se realiza incubación de la placa por 15 minutos a 37°C. Como control negativo se empleó agua desionizada y control positivo veneno de *Crotalus*

*durissus*. La densidad óptica se leyó a 540nm en un espectrofotómetro de microplacas BIO-RAD modelo 550.

### 3.2.3 Actividad Hialuronidasa

Se sembraron 5 µg de veneno crudo de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis* disuelto en PBS 1X. Las muestras fueron corridas por SDS-PAGE en un gel del 10 %, copolimerizado con ácido hialurónico (HA) 0,5 mg/mL (Sal sódica de ácido hialurónico de *Streptococcus equi*, Sigma®). A las muestras se les agregó 4µL de buffer de carga LaemmLi (en condiciones no denaturantes), y no fueron calentadas.

Después de la separación electroforética, los geles se incubaron con PBS pH 5.8 (0,1 M fosfatos, NaCl 0,15 M, Tritón X-100 5%) por una hora a temperatura ambiente, el procedimiento se repitió dos veces. Luego se incubó con PBS pH 5.8 (0,1 M fosfatos, NaCl 0,15 M, Tritón X-100 0.05%), durante una hora y luego se dejó en PBS pH 5.8 (0,1 M fosfatos, NaCl 0,15) por diez minutos y luego los geles se dejaron en cámara húmeda toda la noche. Posteriormente se realizaron dos lavados con Tris-HCl pH 7.95 (0,015 M) y se tiñó durante 5 horas con agitación, utilizando una solución al 5 % de formamida, 20 % isopropanol, Tris-HCl pH 7.95 (0.015M) y 5 mL de Stains all 0,1 %, protegido a la exposición a la luz. Los geles fueron desteñidos durante una hora en agitación constante con 5 % formamida, 20 % isopropanol, Tris-HCl pH 7.95 (0.015 M). La región del gel degradada por hialuronidasas no se tiñó, determinando la actividad mediante esta característica (72), el análisis de los geles se realizó por medio del programa ImageLab 5.2.1 de Bio Rad.

### 3.2.4 Actividad Proteasa

Se copolimerizó un gel de 1,5 mg/mL de gelatina con poliacrilamida al 12,5 % y otro gel de caseína 0,8% con poliacrilamida al 12,5%. Luego se sembraron 5 µg y 25 ug de proteína del veneno crudo de las especies en estudio. Para el control positivo se usaron 2 µg de veneno de *Pterois volitans*.

Después de la separación electroforética, los geles se incubaron en Tris-HCl 0,1 M pH 8.0, tritón X-100 5 %, con agitación constante durante una hora. Luego se incubó con Tris-HCl 0,1 M pH 8.0 tritón X-100 0.05 % durante una hora más. El gel se dejó por una hora más en Tris-HCl 0,1 M pH 8.0. Finalmente se colocaron en una cámara húmeda toda la noche y se realizó tinción con azul de Coomassie; los geles fueron decolorados con ácido acético al 10 % e isopropanol 10 % (73); el análisis de los geles se realizó por medio del programa ImageLab 5.2.1 de Bio Rad.

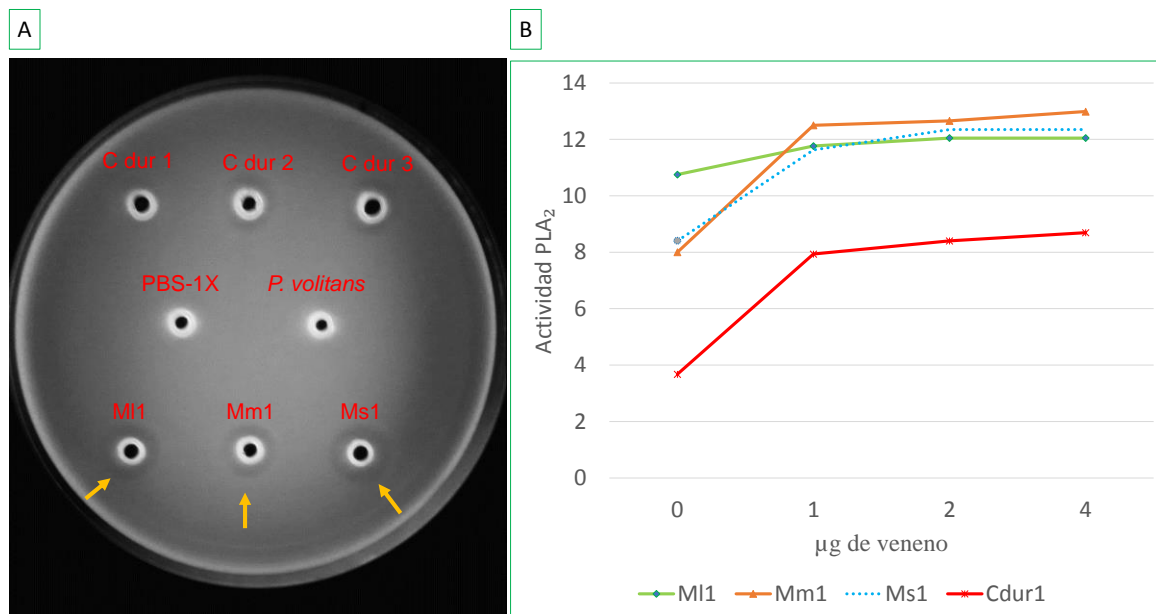
### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>

El ensayo cualitativo usado para determinar la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> de los venenos completos de *Micrurus* permite observar la formación de halos traslucidos alrededor de los pozos, resultado que pudo verse en los venenos de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis*, así como en los venenos de *Crotalus durissus* empleados como control positivo. (Figura 3-2). Esta actividad es ausente en los controles negativos empleados, indicativo de ausencia de PLA<sub>2</sub>, así como en el veneno del pez León de acuerdo a lo determinado por Pérez en 2018 (74).

La actividad PLA<sub>2</sub> en el gel de yema de huevo copolimerizado con agarosa, permite determinar que el veneno de *M. sangilensis* presenta una mayor actividad respecto a los otros dos venenos, esto debido a un diámetro mayor del halo traslúcido.

**Figura 3-2.** Evaluación actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de ML1, Mm1 y Ms1



**Figura 3-2.** Ensayos de fosfolipasa A<sub>2</sub>. Figura A. Ensayo en agarosa y solución de yema de huevo al 10% empleando 5µg de cada uno de los venenos. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). Las Flechas indican los halos traslúcidos formados por cada veneno. Control positivo 5µg de *Crotalus durissus* de diferentes regiones (C. dur 1: *Crotalus durissus* Atlántica; C. dur 2: *Crotalus durissus* Andina; C. dur 3: *Crotalus durissus* Orinoquía), Control negativo solución de PBS-1X y veneno del pez león *Pterois volitans*. Figura B. Metodología descrita por Araujo, ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1), C dur 1: *Crotalus durissus* (región Atlántica).

El ensayo realizado de acuerdo con modificaciones del método de Araujo de igual manera permitió determinar actividad PLA<sub>2</sub>, en las tres muestras de *Micrurus* (Figura 3-2), en el cual se observa una mayor actividad en el veneno de *M. lemniscatus* y actividades similares en los venenos de *M. medemi* y *M. sangilensis*, la actividad del control positivo *C. durissus* fue menor respecto a la de los venenos de *Micrurus*.

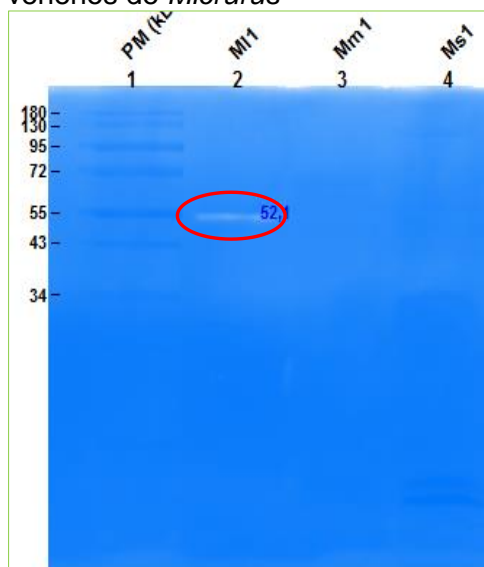
### 3.3.2 Actividad proteasa

Aunque el porcentaje de participación de enzimas de tipo proteasa es bajo en el veneno de elápidos con relación a los vipéridos, fue posible determinar esta actividad de forma leve en los zimogramas realizados a partir de la copolimerización del gel con gelatina y con

caseína empleando 25µg de proteína, el ensayo realizado con 5 µg no permitió detectar ningún tipo de actividad proteolítica sobre el gel. (Figuras 3-3 y 3-4)

El veneno de *Micrurus lemniscatus* presento actividad sobre el gel copolimerizado con caseína, permitiendo detectar una banda a los 52,1 kDa, los venenos de *M. medemi* y *M. sangilensis* no presentaron ningún tipo de actividad frente al sustrato (Figura 4-6).

**Figura 3-3.** Zimograma actividad proteasa en gel co-polimerizado con caseína 0,8% en venenos de *Micrurus*

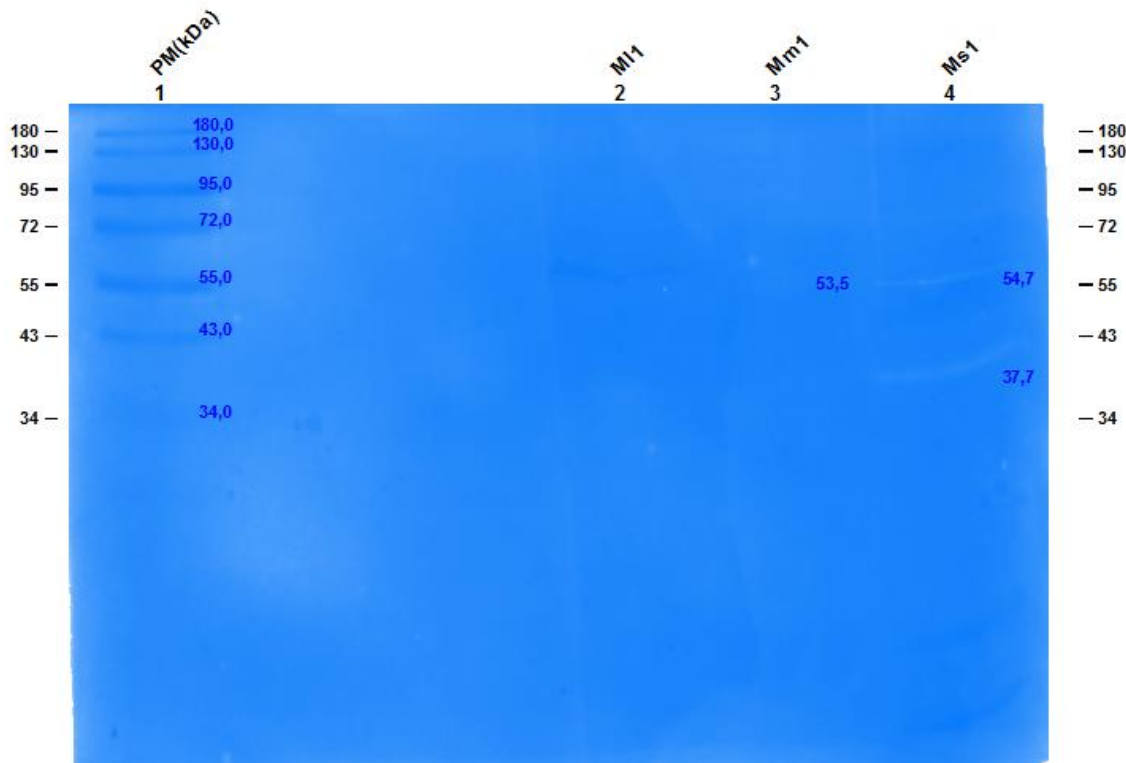


**Figura 3-3.** Gel SDS-PAGE 12,5% copolimerizado con caseína 0,8%. Se emplearon 25 µg de cada veneno. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). Análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

El gel copolimerizado con gelatina no mostró mayor actividad para los tres venenos estudiados, sin embargo, fue posible detectar líneas tenues para *M. sangilensis* en los pesos moleculares de 54,7 y 37,7 kDa, el veneno de *M. medemi* presento una banda casi imperceptible a los 53,5 kDa (Figura 3-4).

Aunque este tipo de metodología no ha sido usada con venenos de *Micrurus*, es posible considerar que la actividad proteasa de estos venenos es baja y se correlaciona con resultados de la caracterización de esta actividad mediante metodologías diferentes.

**Figura 3-4.** Zimograma actividad proteasa gel co-polimerizado con gelatina (Cf 1,5 mg/mL) en venenos de *Micrurus*



**Figura 3-4.** Gel SDS-PAGE 12,5% copolimerizado con gelatina (Cf 1,5 mg/mL) Se emplearon 25 µg de cada veneno. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). Análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

### 3.3.3 Actividad hialuronidasa

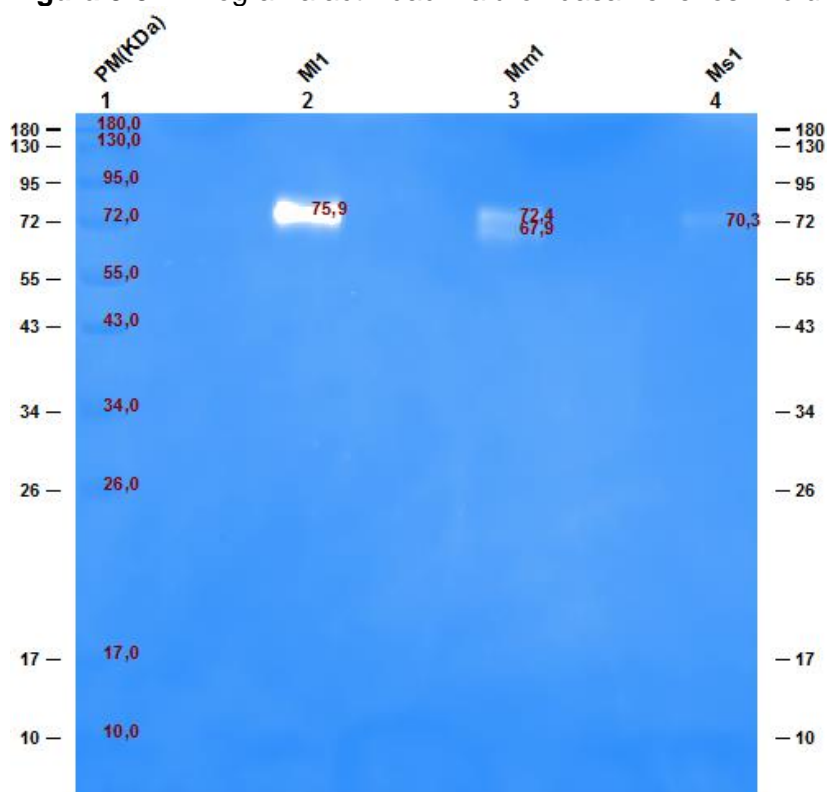
Como se describió los venenos de serpientes pueden contener hialuronidasas en su composición, al ser considerados como factores dispersantes, pero no parecen tener un papel muy relevante en los venenos de este género. Por lo tanto, se optó por realizar un Zimograma (Figura 3-5) que permitiera identificar la actividad y el peso molecular de las proteínas que realizaban la hidrólisis del ácido hialurónico, observándose en el gel como bandas no teñidas.

La presencia de bandas blancas, sin fijación de la tinción Stains all, es indicativo de acción de hialuronidasas sobre el gel de electroforesis, los tres venenos de *Micrurus* (*M.*



*lemniscatus*, *M. medemi*, *M. sangilensis*), presentan por lo menos una banda ubicada alrededor de los 72 kDa, indicando la presencia de esta enzima como componente de los venenos completos (Figura 3-5)

**Figura 3-5.** Zimograma actividad hialuronidasa venenos *Micrurus*



**Figura 3-5.** Con base al método de Laemmli en gel de 12,5% co-polimerizado con ácido hialurónico 0,5 mg/mL y 5 µg de cada uno de los venenos. ML1: veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* (descrito en 2.5.1). Mm1: *Micrurus medemi* (descrito en 2.5.1). Ms1: *Micrurus sangilensis* (descrito en 2.5.1). Análisis de la imagen con Image Lab 6.0 de Bio-Rad.

### 3.4 Discusión

La actividad de ML1, Mm1 y Ms1 en el gel de agarosa y yema de huevo al 10%, presenta una mayor intensidad respecto a los venenos de *Crotalus durissus*, posiblemente debido a un mayor porcentaje de PLA<sub>2</sub> en su veneno.

En los venenos de las serpientes del género *Micrurus* aparte de componentes como 3FTx y PLA<sub>2</sub> han sido identificadas enzimas como las hialuronidasas y proteasas. Desde el abordaje de la venómica, para los venenos de *M. dumerilii* y *M. alleni* han sido identificadas estas enzimas, presentando baja actividad posiblemente asociada al escaso porcentaje de ellas en el proteoma (16,49). Esto podría explicar la poco evidente actividad de proteasas en los venenos de *M. lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis* (Figura 3-3 y Figura 3-4), y la baja actividad de hialuronidasa en el veneno de *M. sangilensis* observada en el zimograma (Figura 3-5).

Las fosfolipasas como se mencionó en la sección 2.3.1 perturban la integridad estructural de las bicapas lipídica, mediante la hidrólisis de los fosfolípidos en el enlace acilo sn-2, que componen la membrana, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, esta enzima se caracteriza por su efecto neurotóxico a nivel de la placa neuromuscular en los venenos de *Micrurus*, sin embargo, también podría generar efectos como miotoxicidad, cardiotoxicidad, actividad bactericida, hipotensión y edema (29,30,35).

La evaluación de esta actividad mediante dos metodologías diferentes permitió corroborar su presencia en los venenos completos de las especies en estudio, como se evidencia en la presencia de halos traslúcidos en los venenos, efecto de la hidrólisis de esta enzima sobre la yema de huevo (Figura 3-2). El método empleado con base a Araujo permitió demostrar que con cantidades menores a 1ug de veneno, la lecitina empleada como sustrato empieza a ser hidrolizada (Figuras 3-2), indicando que la actividad de esta enzima es alta, sugiriendo que el principal componente de estos venenos es la PLA<sub>2</sub>.

La presencia de la enzima hialuronidasa en el veneno, indica que esta puede favorecer la absorción y distribución del veneno en los tejidos del organismo. Ya que su mecanismo de acción cataliza la degradación de ácido hialurónico, que se encuentra en la matriz extracelular en el tejido conectivo, ayudando a que los demás componentes del veneno a una mayor difusión, encontrándose su masa molecular entre 28 a 110 kDa (Tabla 2-4) (44,46). Rey-Suarez en 2016 y Fernández en 2015 (16,48), identificaron esta proteína en el proteoma de los venenos de *M. dumerilii* y *M. alleni*, en los 65 y 80 kDa, pesos moleculares similares a los encontrados en los zimogramas de *M. lemniscatus*, *M. medemi*

y *M. sangilensis* (entre 67,9-75,9 kDa) (Figura 4-8). Esta información permite suponer que nuestro hallazgo corresponde a una enzima con actividad hialuronidasa.

La presencia de esta enzima es muy variable en los venenos de *Micrurus*, expresándose con baja actividad o ausencia en presencia del ácido hialurónico al ser evaluada mediante ensayos turbidométricos, como se ha demostrado para los venenos de *M. altirostris*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. fulvius*, *M. hemprichii*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* y *M. surinamensis* (17,19), variación que también estuvo presente en los venenos evaluados en este trabajo.

Las proteasas presentes en los venenos de *Micrurus* se encuentran en un bajo porcentaje del proteoma de su veneno, encontrándose en menos del 5% del veneno total (11,16,48), por lo cual su actividad enzimática tiende a ser mínima (17,19,69). Diversos autores han realizado estudios enzimáticos de la caracterización del veneno de serpientes *Micrurus* con diversos sustratos como azocoll, azoalbumina y azocaseína entre otros, sin embargo ninguna metodología hace referencia al uso de geles copolimerizados con gelatina o caseína.

Los zimogramas de la Figura 3-3 y 3-4, muestran presencia de actividad para *M. lemniscatus* en el gel de caseína en 56,1 kDa, y para *M. medemi* y *M. sangilensis* una muy leve actividad en 53,5 kDa para *M. medemi* y 34,7 y 54,7 kDa para *M. sangilensis*. Estudios proteómicos revelan que las metaloproteasas del veneno de *Micrurus* pueden encontrarse entre 25 y 68 kDa (11,16,22,48), y las serin proteasas alrededor de los 15 y 30 kDa (11,16,22); lo cual puede indicar que las bandas encontradas en los zimogramas correspondan a metaloproteasas de tipo 3.

## 4. Evaluación actividad biológica del veneno.

### 4.1 Estado del arte.

#### 4.1.1 Dosis Letal 50

La actividad letal es el efecto toxicológico que más frecuentemente se estudia al caracterizar un veneno. Este efecto es el resultado de la acción sinérgica del veneno completo. En el caso de venenos de la familia Elapidae, se encuentra mediado por la acción de componentes neurotóxicos que interfieren en la sinapsis a nivel de la placa neuromuscular, dando una aproximación a la neurotoxicidad generada por el veneno (20). Son varios los venenos de *Micrurus* que han sido objeto de estudio de su letalidad ver Tabla 4-1.

**Tabla 4-1.** DL<sub>50</sub> venenos de *Micrurus*

Especie	DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	Referencia	Especie	DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	Referencia
<i>M. albicinctus</i>	im 0,8 ip 0,7 iv 0,5	(17)	<i>M. ibiboboca</i>	Im 1,8 Ip 1,5 Iv 1,2	(17)
<i>M. alleni</i>	iv 0,23-0,55 iv 0,74±0,16	(48)	<i>M. lemniscatus</i>	Im 0,4-0,7 Ip 0,2-0,5 Iv 0,1-0,3	(17)
<i>M. altirostris</i>	ip 0,26-0,65 im 0,6-0,7 ip 0,5 iv 0,2-0,3	(49) (17)	<i>M. mipartitus</i>	ip 0,47	(15)
<i>M. baliocoryphus</i>	im 0,6 ip 0,5 iv 0,4	(17)	<i>M. mosquitensis</i>	iv 0,20-0,61	(48)
<i>M. brasiliensis</i>	im 0,7 ip 0,6 iv 0,5	(17)	<i>M. multifasciatus</i>	ip 1,35	(15)

Especie	DL <sub>50</sub> (μg/g ratón)	Referencia	Especie	DL <sub>50</sub> (μg/g ratón)	Referencia
<i>M. clarki</i>	iv 0,42-1,38	(22)	<i>M. nigrocinctus</i>	iv 0,3-0,5 ip 0,4-1,2	(53)
<i>M. corallinus</i>	ip 0,25-1,35 im 0,2 ip 0,09 iv 0,04	(49) (17)	<i>M. pyrrhocryptus</i>	Im 0,7 Ip 0,6 Iv 0,5	(17)
<i>M. dumerilii</i>	ip 0,8-1,9	(16)	<i>M. spixii</i>	Im 0,7-1,2 Ip 0,4-0,9 Iv 0,2-0,8	(17)
<i>M. frontalis</i>	ip 0,20-1,45 im 0,7-0,8 ip 0,6 iv 0,5-0,4	(19) (17)	<i>M. surinamensis</i>	ip 2,15-4,35 Im 0,6-0,8 Ip 0,4-0,6 Iv 0,2-0,4	(19) (17)
<i>M. fulvius</i>	iv 0,32±0,12 ip 2,60-4,40	(51) (19)	<i>M. tener</i>	sc 4,4 iv 0,78±0,14	(53) (55)
<i>M. hemprichii</i>	Im 2 Ip 1,7 Iv 1,5	(17)	<i>M. tshudii</i>	ip 0,44-0,81	(54)

En estudios específicos desarrollados a partir del veneno de *M. lemniscatus* se ha encontrado que su dosis letal puede variar entre 5-10μg de veneno por ratón (57), pero al intentar probar fracciones de este veneno no se encontró actividad letal en concentraciones menores a 40μg/ ratón, lo cual sugiere un efecto sinérgico entre los componentes del veneno.

Como puede observarse la letalidad varía para cada uno de los venenos, actividad asociada a diferencias en la composición de sus venenos, con mayor o menor participación de PLA<sub>2</sub> y 3FTx (15,54).

#### 4.1.2 Actividad coagulante

La actividad coagulante de los venenos, tradicionalmente se pueden determinar sobre plasma o sobre una solución de fibrinógeno. Esta actividad se realiza de manera *in-vitro* empleando plasma humano citratado o usando fibrinógeno. En vipéridos esta actividad se asocia a la presencia de Serin proteasa o metaloproteinasas que actúen sobre el fibrinógeno, Factor X o sobre la protrombina (20). Rey-Suárez, asocio el efecto coagulante en su gran mayoría a la presencia de PLA<sub>2</sub> en el veneno, reportándolo de manera leve en los venenos de *M. mipartitus* (15). Venenos con determinación de esta actividad se listan a continuación (Tabla 4-2)

**Tabla 4-2.** Venenos con determinación de actividad coagulante

Especie	Referencia
<i>M. dumerilii</i> <sup>1</sup>	(16)
<i>M. frontalis</i>	(33)
<i>M. lemniscatus</i>	(33)
<i>M. mipartitus</i>	(13,15)
<i>M. nigrocinctus</i>	(33)
<i>M. surinamensis</i>	(33)

**Tabla 4-2.** <sup>1</sup> especie de *Micrurus* colombiana.

Henao y Nuñez en 2016, evaluaron esta actividad sobre varios individuos de la especie *M. mipartitus*, observando que estos tenían un efecto anticoagulante, uno de los individuos inclusive llegó a registrar un tiempo de coagulación de a 261 segundos (13). Rey-Suarez y colaboradores en 2011, evaluaron esta actividad comparando venenos de *M. mipartitus* de Colombia y Costa Rica y registrando sus tiempos de coagulación en un lapso de 30 minutos, el resultado mostró que el veneno de Colombia posee actividad anticoagulante respecto al veneno costarricense, los autores atribuyen esta diferencia a la presencia de PLA<sub>2</sub> del veneno(15), este mismo efecto anticoagulante ha sido descrito también en la especie *M. dumerilii* de Colombia la cual registra tiempos de coagulación mayores a *M. mipartitus* (16)

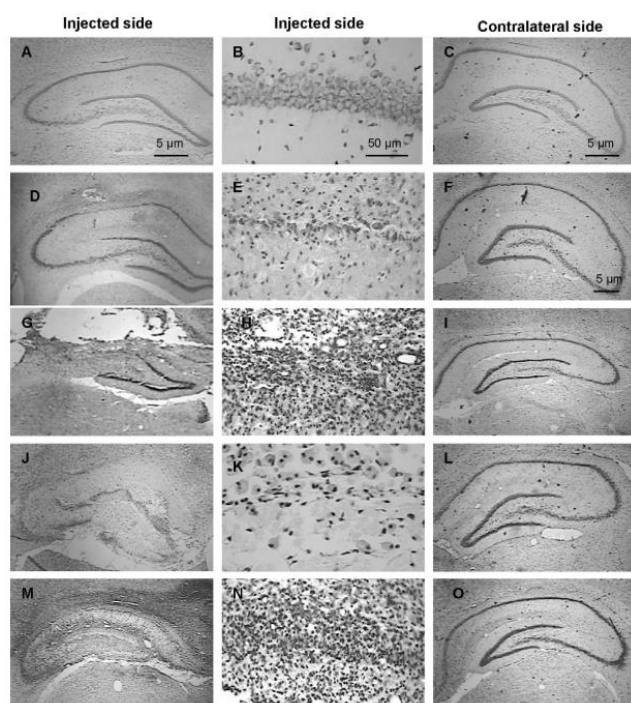
### 4.1.3 Citotoxicidad

Son pocos los estudios de citotoxicidad con venenos de *Micrurus* que se encuentran reportados en la literatura, sin embargo se encuentran estudios realizados con neurotoxinas presinápticas de vipéridos y elápidos, en estos se ha demostrado la presencia de ellas al interior de la célula, por un lado en el caso de una toxina de elárido la  $\beta$ -Bungarotoxina conjugada con fluoresceína, la cual se vio ingresar en neuronas hipocámpales y por otro lado para una toxina de vipérido Ammodytoxin A (PLA<sub>2</sub> aislada de *Vipera ammodytes*) conjugada con un fluoróforo, esta fue encontrada en el núcleo de neuronas hipocámpales y el citosol de células indiferenciadas NSC34 (Neuroblastoma de ratón X línea celular de medula espinal) (37), este estudio determinó que la PLA<sub>2</sub>

neurotóxica ingresa a las células, específicamente a la mitocondria e induce cambios en su morfología y apertura de poros en la membrana mitocondrial que conllevan a la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo cual potenciaría el efecto neurotóxico de la  $\text{PLA}_2$ .

En el caso particular de los venenos motivo de estudio, se han encontrado investigaciones desarrolladas con *Micrurus lemniscatus*, uno de ellos evaluó citotoxicidad en cortes histológicos de hipocampo posterior a la inoculación intrahipocampal, evidenciando neurodegeneración 7 días post inoculación (Figura 4-1). Carvalho y colaboradores, (75) evaluaron algunas fracciones de  $\text{PLA}_2$  de *Micrurus lemniscatus* en cultivo celular de neuronas hipocampales de rata, encontrando aumento del calcio citosólico libre y reducción del potencial transmembranal mitocondrial, así como cambios morfológicos y disminución de viabilidad celular por pruebas de MTT y LDH en concentraciones de 0,74 y 7,4 nM.

**Figura 4-1.** Hipocampo en ratas posterior a inoculación intrahipocampal.



Fuente: Tomado de (57)

**Figura 4-1.** Hipocampo de ratas evaluado mediante análisis histológico 7 días post-inoculación. Cuadros A, B y C corresponden al control, los demás corresponden a las diferentes fracciones de veneno de *M. lemniscatus*.

## 4.2 Metodología.

### 4.2.1 Dosis Letal 50.

La actividad letal es el efecto toxicológico que más frecuentemente se estudia al caracterizar un veneno y es el resultado de la acción de diversos tipos de componentes, para venenos de la familia Elapidae, este efecto es el resultado de la acción de componentes neurotóxicos que interfieren con los procesos de sinapsis, mediante el bloqueo de la placa neuromuscular. Se prepararon diluciones seriadas de veneno disueltas en 500 µl de NaCl 0,85%, las cuales fueron inoculadas por vía intraperitoneal. Fueron evaluadas entre 7 y 9 diluciones para cada veneno con un factor de dilución entre 1,5 y 1,7 en el intervalo de concentraciones de 0,8 a 68,344 µg /ratón. Como control negativo se emplearon 500 µl de NaCl 0,85%. Se realizó lectura de la prueba 48 horas posterior a la inoculación. La dosis letal 50 corresponderá a la dosis de veneno que induce mortalidad en el 50% de la población, los resultados de la prueba se determinaron mediante el análisis estadístico de Spearman-Kärber (20)

El ensayo se realizó en el Bioterio ABSL2 del Instituto Nacional de Salud, con el acompañamiento de la profesional encargada de las pruebas biológicas de venenos de serpientes del Laboratorio de Control de Calidad del INS, acorde a los Métodos de ensayo que tiene establecidos el INS para los cuales se han realizado las estandarizaciones y validaciones pertinentes. Durante el ensayo experimental los animales no fueron sometidos a ningún estrés adicional a la inoculación del veneno, las condiciones de alojamiento de los animales fueron controladas y permanecieron con alimento y agua *ad-libitum*.

### 4.2.2 Actividad coagulante.

La actividad coagulante de los venenos se puede determinar sobre plasma humano citratado, al cual de manera *in-vitro* se le agregaron diferentes cantidades de veneno previamente disuelto en solución de NaCl 0,85%. La actividad se estableció de acuerdo al protocolo interno del INS MEN-R04.6022-045 “Determinación de la actividad coagulante”,



Se evaluaron 6 diluciones en cada veneno y un factor de dilución de 2 para el intervalo de concentraciones de 1,5 a 48 µg. Se midieron los tiempos de coagulación del plasma luego de agregar las diferentes concentraciones de veneno.

Los datos obtenidos permitieron calcular la Dosis Coagulante Mínima sobre plasma (DCM-P<sup>4</sup>), mediante un análisis de regresión lineal (20).

#### 4.2.3 Citotoxicidad.

La citotoxicidad de los venenos completos de las tres especies de *Micrurus* se evaluaron en cultivo primario de neuronas hipocampales, provenientes de fetos de 18 días de ratas Wistar, de acuerdo a la metodología descrita (76,77) y realizada previamente por el GRIP en el 2016 (78), así como en la línea celular HTB-132 (adenocarcinoma, derivado de glándula mamaria, efusión pleural de sitio metastásico, morfología: epitelial de tipo adherente) (79).

Para el cultivo primario la placa de 96 pozos fue tratada en cabina de flujo laminar previamente al ensayo con poli-D-lisina (PDK) por 12 horas y lavadas con H<sub>2</sub>O MiliQ estéril para eliminar exceso de PDK. Una vez secos los pozos de la placa se adicionó el volumen con suspensión de neuronas para obtener la densidad requerida y se completó a 100 µL en cada pozo con medio PNGM (constituido por: PNBM (Primary Neuron Basal Medium), 2 % de NSF-1, 2 mM de L-Glutamina; antibiótico 50 µg/mL de Gentamicina y 37 ng/mL de Anfotericina). El medio se cambió cada tres días *in vitro* (DIV). Manteniendo el cultivo primario en incubación bajo condiciones controladas de temperatura (37 °C) y CO<sub>2</sub> (5 %). Pasado este tiempo, la placa se inspeccionó bajo microscopio invertido para evidenciar la adherencia de células y la formación de la monocapa.

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 20.000 células/pozo en 100 µL de medio de cultivo PNGM, se incubaron a 37°C en atmosfera húmeda y CO<sub>2</sub>

---

<sup>4</sup> DCM-P: corresponde a la concentración de veneno que induce la coagulación del plasma humano citratado en 60 segundos

al 5%, al sexto día de diferenciación neuronal *in vitro*, se realizó el estímulo con el veneno de *Micrurus lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis* en un rango de concentraciones entre 1 - 100 µg/mL y medio PNGM como control negativo para determinar el 100 % de viabilidad celular durante 24 horas.

Para la línea celular HTB-132, las células se sembraron en placa de 96 pozos a una densidad de 10000 células/pozo en 100 µL de medio de cultivo con 10 % de SFB y 10 % de antibiótico-antimicótico, y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5 %, durante 24 horas. La placa se inspeccionó bajo microscopio invertido para evidenciar la adherencia de las células y la formación de la monocapa. Con el fin de observar efectos dosis respuesta sobre la viabilidad celular, estas se trataron por 36 horas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad con los extractos de veneno en un rango de concentraciones entre 1 - 100 µg/mL (en medio suplementado con SFB) y únicamente RPMI suplementado con SFB 10 %, como control negativo para determinar el 100 % de viabilidad celular.

El efecto sobre la actividad metabólica celular en el cultivo primario y la línea celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico con MTT (80). A las 24 y 36 horas respectivamente, se adicionó 10 µL de MTT (5 mg/mL en PBS 1X) a cada uno de los pozos y se incubó por 3 horas. Posteriormente se descartó el medio de cultivo y se dejaron decantar los cristales de formazán, los cuales se solubilizaron con 100 µL DMSO 100 % durante 30 minutos a 37 °C. Una vez terminado el proceso de solubilización se leyó absorbancia a 540 nm (80). Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se evaluaron usando ANOVA de un factor y prueba de comparaciones múltiples por Tukey (Anexo F).

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Dosis letal 50- DL<sub>50</sub>

Las pruebas de DL<sub>50</sub> fueron realizadas bioterio ABSL2 del INS, con el acompañamiento del personal de Control de Calidad de la Dirección de Producción del Instituto Nacional de Salud en el en ratones cepa ICR-CD1 con pesos entre 16 y 20g (Ver 4.2.1).

Los resultados de las pruebas sobre el modelo animal mostraron gran variación entre los tres venenos evaluados, el veneno de *Micrurus medemi* es el de mayor letalidad, requiriendo menos  $\mu\text{g}$  de veneno inyectado para producir su muerte en un tiempo de 48 horas, respecto a los venenos de *M. lemniscatus* y *M. sangilensis* (Tabla 4-3).

**Tabla 4-3.** Dosis letal 50 venenos de *Micrurus*

ESPECIE	DL <sub>50</sub> <sup>1</sup>	LI95% <sup>2</sup>	LS95% <sup>2</sup>
<i>M. lemniscatus</i>	13,19 $\mu\text{g}$ /ratón	N. A	N. A
<i>M. medemi</i>	8.79 $\mu\text{g}$ /ratón	7.16	10.80
<i>M. sangilensis</i>	15,85 $\mu\text{g}$ /ratón	11,55	21,75

**Tabla 4-1.**<sup>1</sup>Resultados DL<sub>50</sub> con base a un peso vivo del animal entre 16 y 20g.<sup>2</sup>Límites obtenidos a partir del análisis con Spearman Karber.

### 4.3.2 Actividad coagulante

Ninguno de los venenos reportó actividad coagulante en un tiempo menor a 60 segundos, en los rangos de concentración propuestos.

### 4.3.3 Citotoxicidad

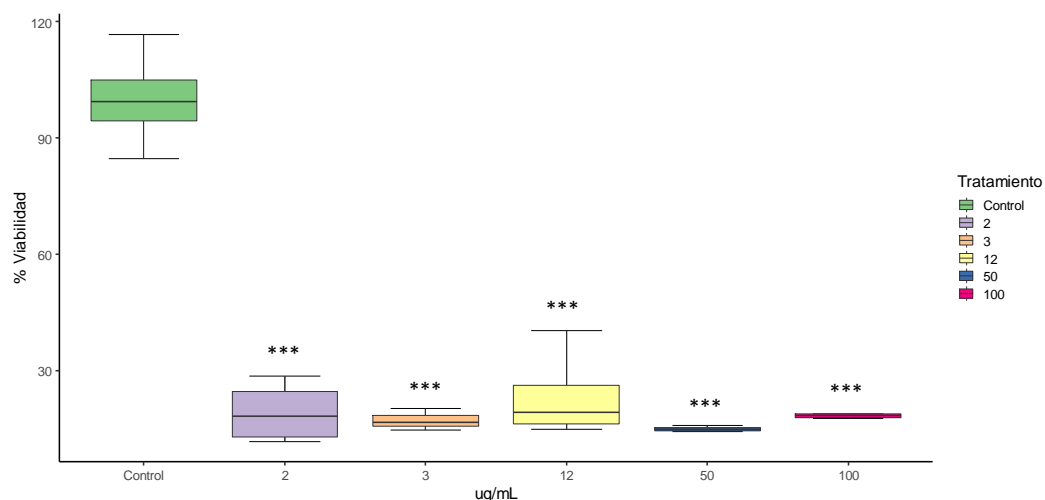
- Citotoxicidad en Cultivo primario

Con el fin de evaluar la actividad neurotóxica de cada uno de los venenos disueltos en PBS-1X sobre neuronas, se evaluó la actividad con el cultivo primario de neuronas hipocampales de embriones de rata Wistar. A continuación, se describen los resultados obtenidos.

El ensayo de MTT muestra que el veneno completo de *Micrurus lemniscatus*, presentó un marcado efecto citotóxico asociado a los bajos porcentajes de viabilidad celular, menor al 50% para las diferentes concentraciones ensayadas entre 2 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el control con

un  $p \leq 0,001$ , (Figura 4-2). Sin diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos.

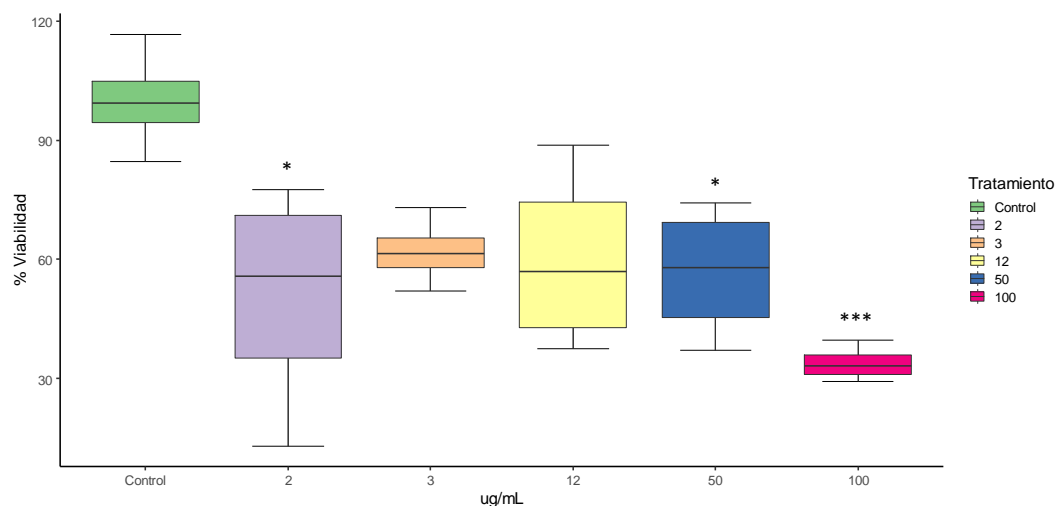
**Figura 4-2.** Porcentaje de viabilidad en cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar tratadas con ML1.



**Figura 4-2.** Ensayo de citotoxicidad con cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar y ML1 a partir del método de MTT a las 24 horas de aplicado el tratamiento. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Tukey para comparaciones múltiples, \*\*\* $p \leq 0,001$ .

El ensayo de MTT que evaluó el veneno de *Micrurus medemi*, indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los controles y las concentraciones de 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $p \leq 0,05$ ) y 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p \leq 0,001$ ) como puede verse en la figura 4-3. Sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos empleados en el ensayo.

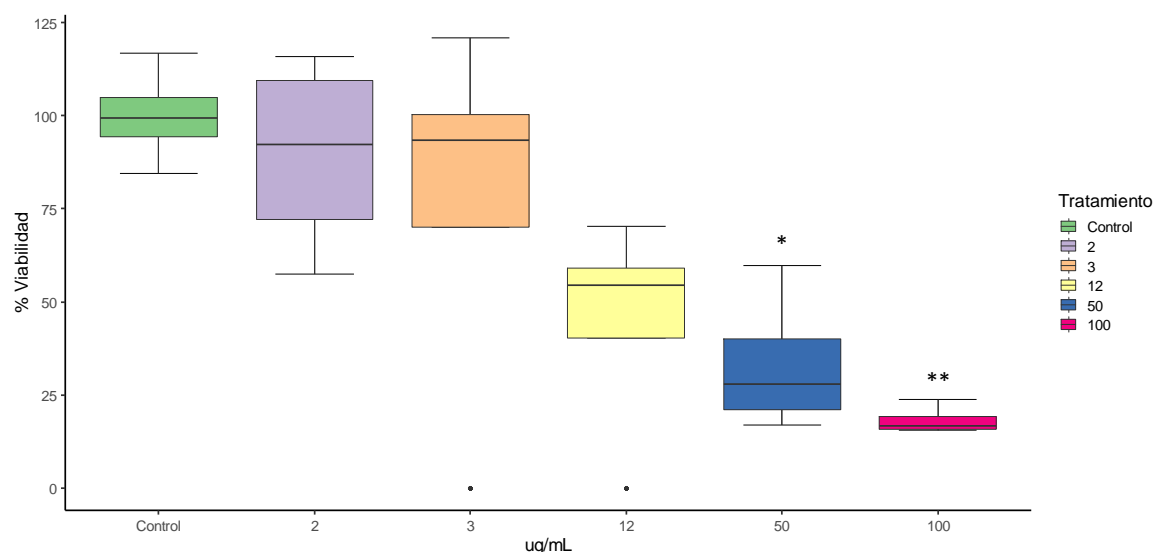
**Figura 4-3.** Porcentaje de viabilidad en cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar con Mm1.



**Figura 4-3.** Ensayo de citotoxicidad con cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar y Mm1 a partir del método de MTT a las 24 horas de aplicado el tratamiento. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Tukey para comparaciones múltiples, \* $p \leq 0,05$  y \*\*\* $p \leq 0,001$ .

El ensayo de citotoxicidad del veneno completo de *Micrurus sangilensis*, muestra menor porcentaje de viabilidad en las concentraciones de 50  $\mu\text{g/mL}$  (\* $p \leq 0,05$ ) y 100  $\mu\text{g/mL}$  (\*\* $p \leq 0,01$ ). Sin embargo, las concentraciones de 2, 3 y 12  $\mu\text{g/mL}$  no presentan una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de viabilidad neuronal respecto a los controles (Figura 4-4). Al comparar los tratamientos entre ellos, fue posible determinar diferencias entre las medias de las concentraciones 2 y 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p \leq 0,05$ ), los demás tratamientos no presentaron ninguna diferencia.

**Figura 4-4.** Porcentaje de viabilidad en cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar tratadas con Ms1.



**Figura 4-4.** Ensayo de citotoxicidad con cultivo primario de neuronas hipocampales de rata Wistar y Ms1 a partir del método de MTT a las 24 horas de aplicado el tratamiento. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Tukey para comparaciones múltiples, \*\* $p \leq 0,01$  y \* $p \leq 0,05$ .

Los resultados del ensayo de citotoxicidad en el cultivo primario de neuronas muestran un bajo porcentaje de viabilidad para los tres venenos en las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , siendo el veneno de *Micrurus lemniscatus* el que presento una disminución de la viabilidad constante para los diferentes tratamientos.

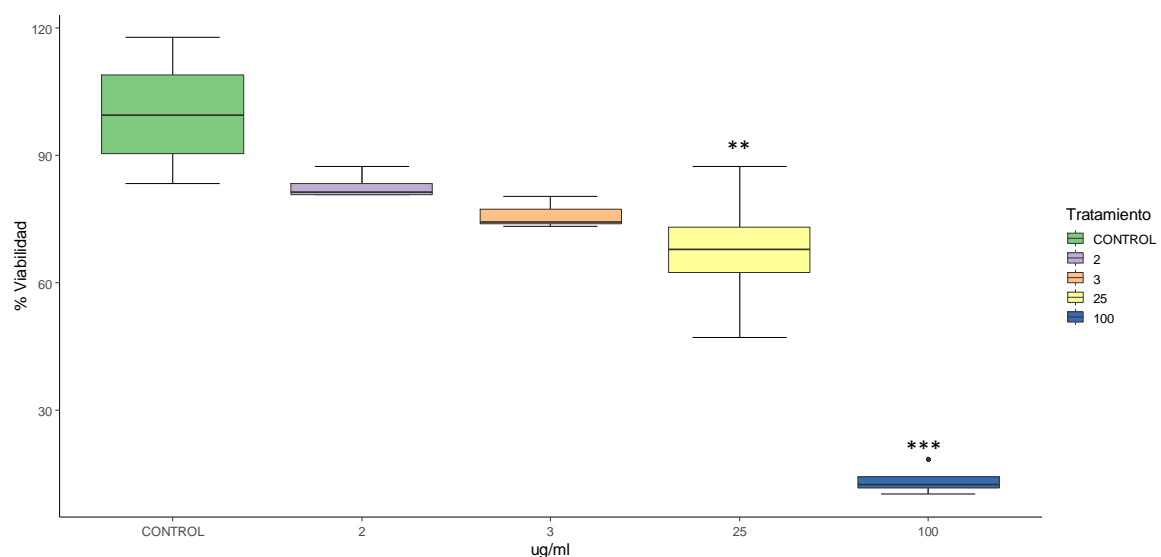
Respecto a la evaluación de los tres venenos se demostró que el veneno completo posee componentes tóxicos específicos a neuronas. Sin embargo, esto puede ser efecto del trabajo sinérgico de diferentes compuestos proteicos y no proteicos, que potencien la actividad neurotóxica.

- Citotoxicidad en línea celular

De manera complementaria se evaluó la actividad citotóxica de los venenos en una línea celular cancerosa de seno, con el fin de determinar las posibles aplicaciones de los venenos en su tratamiento, es de recordar que la prueba se realizó con veneno completo por lo cual sería necesario complementar la información con fracciones del mismo.

El veneno completo de *Micrurus lemniscatus* en el ensayo de citotoxicidad con MTT, mostró un patrón dosis dependiente para las concentraciones ensayadas, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el control y las concentraciones 25 y 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p\text{-valor} < 0,01$  y  $0,001$  respectivamente) (Figura 4-5). al evaluar las diferencias entre cada uno de los tratamientos es posible afirmar que la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ , presenta una diferencia significativa con las demás, demostrado por un  $p\text{-valor}$  menor o igual a 0,001.

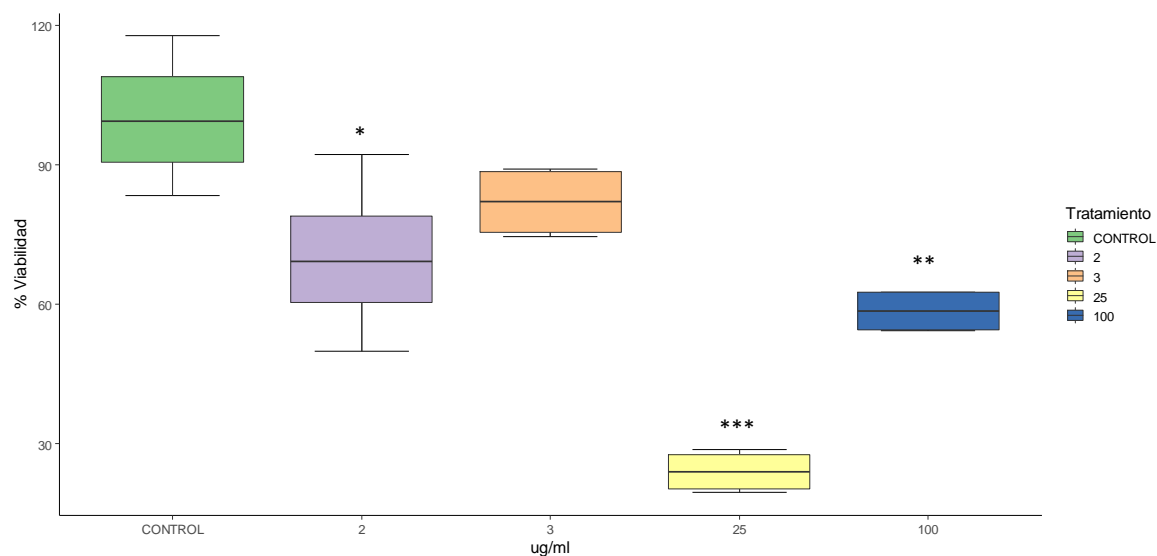
**Figura 4-5.** Porcentaje de Viabilidad celular en línea HTB-132 tratada con ML1



**Figura 4-5.** Ensayo de citotoxicidad con línea celular HTB-132 y ML1 a partir del método de MTT a las 36 horas de aplicado el tratamiento. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Tukey para comparaciones múltiples, \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$ .

El ensayo de citotoxicidad realizado con veneno de *Micrurus medemi*, indica que no hay diferencias estadísticas entre la concentración de 3 µg/mL y el control, sin embargo con los demás tratamientos si se presentan diferencias significativas (Figura 4-6), realizando comparaciones entre las medias de los tratamientos se encuentra que la concentración de 25 µg/mL presenta diferencias significativas con las concentraciones de 2 y 3 µg/mL (\*\* $p \leq 0,001$ ) y con la concentración de 100 µg/mL (\*\* $p \leq 0,001$ ).

**Figura 4-6.** Porcentaje de Viabilidad de la línea celular HTB-132 tratada con Mm1.



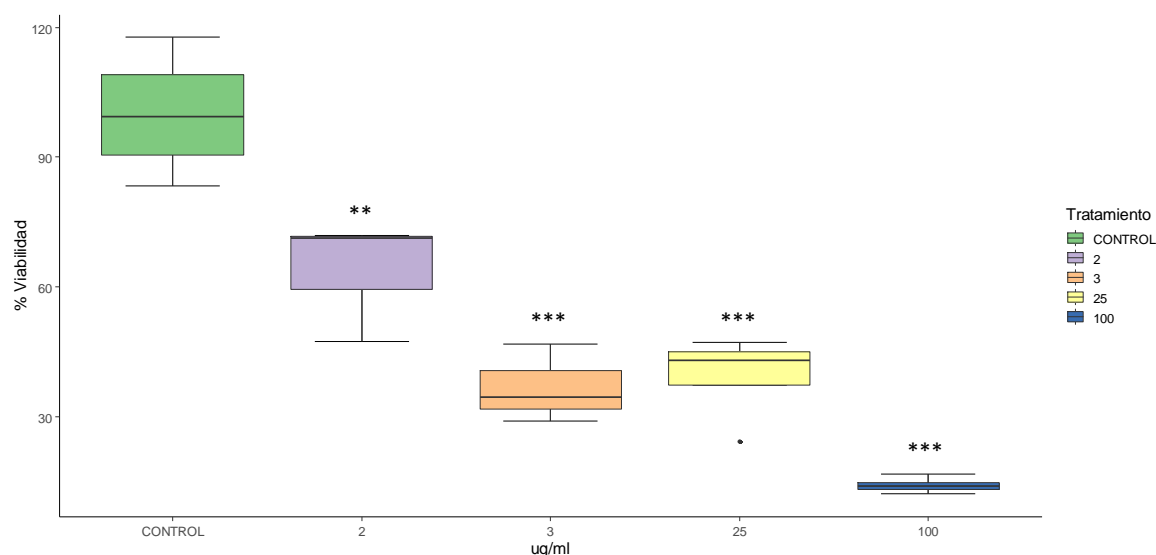
**Figura 4-6.** Ensayo de citotoxicidad con línea celular HTB-132 y Mm1 a partir del método de MTT a las 36 horas de aplicado el tratamiento. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Tukey para comparaciones múltiples, \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$ .

El ensayo de citotoxicidad sobre línea celular HTB-132 del veneno completo de *Micrurus sangilensis*, muestra un comportamiento dosis dependiente, teniendo todos los tratamientos diferencias estadísticas con el grupo control (Figura 4-7). Al evaluar las medias entre el porcentaje de viabilidad celular de los tratamientos se encontró que la concentración de 100 µg/mL presenta diferencias significativas con las concentraciones de



2 y 25  $\mu\text{g/mL}$  (\*\* $p \leq 0,001$  y \* $p \leq 0,005$  respectivamente), sin embargo, con la concentración de 3  $\mu\text{g/mL}$  no hay variación.

**Figura 4-7.** Porcentaje de viabilidad de la línea celular HTB-132 tratada con Ms1



**Figura 4-7.** Ensayo de citotoxicidad con línea celular HTB-132 y Ms1 a partir del método de MTT a las 36 horas de aplicado el tratamiento. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS. La diferencia estadística entre el tratamiento y control fue determinada por ANOVA de un factor y posterior prueba de Tukey para comparaciones múltiples, \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$ .

## 4.4 Discusión

Debido a que no se realizó separación de fracciones del veneno, es difícil saber cómo contribuye cada componente a la mortalidad en el modelo animal murino, en la actividad coagulante, así como a los ensayos de citotoxicidad, con base en esto tendremos que suponer que el efecto se debe a la sinergia de los componentes peptídicos y proteicos propios de cada uno de los venenos, sin embargo, es necesario que en próximas oportunidades se evalúe el efecto de cada uno de los constituyentes del veneno y así poder realizar una comparación y caracterización más completa.

La dosis letal cincuenta  $DL_{50}$  fue usada en conjunto con la prueba de neurotoxicidad en cultivo primario, como parámetro para evaluar la neurotoxicidad de los venenos, los cuales

fueron ensayados en el modelo animal murino mediante inyección intraperitoneal de diferentes concentraciones del veneno y lectura de mortalidad a las 48 horas post inoculación. Los valores de letalidad fueron variables para las tres especies, siendo el más letal *M. medemi* (Tabla 4-1). Estas diferencias interespecíficas se deben a fluctuaciones en el perfil proteico de cada veneno como se observó anteriormente (Figuras 2-9 a 2-11) y ha sido reportado por varios autores(15,19)

Oliveira y colaboradores en 2008, inyectaron vía intravenosa diferentes concentraciones de las fracciones Mx-8, Mlx-9, Mlx-10 y Mlx-11 en ratas, sin que se generara mortalidad, sin embargo al cambiar la vía de inoculación a la vía intrahipocámpal se generaron diversas manifestaciones de intoxicación (comportamiento compulsivo, convulsiones tónico-clónicas, dificultad respiratoria) y muerte en una relación dosis dependiente (57). Lo cual indica que estas toxinas pueden tener un mayor tropismo sobre el tejido hipocámpal, que un efecto generalizado sobre el individuo.

El efecto coagulante del veneno de las serpientes *M. lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis* no fue observado en ninguno de los venenos; la baja proporción de proteasas en el veneno observadas en estos venenos, podrían explicar la ausencia de actividad coagulante sobre el plasma citratado humano, los cuales son resultados acordes a lo reportado para otras especies Colombianas como lo son *M. mipartitus* y *M. dumerilii* con tiempos de coagulación superior a los 30 minutos (13,15,16), Rey-Suarez y colaboradores (15), demuestran que este aumento en los tiempos de coagulación puede estar asociado a la participación de fosfolipasas de tipo A2 en los venenos. Estos resultados también son similares a lo reportado por Cecchini y colaboradores en 2005(33), quienes registraron tiempos de coagulación mayores a 45 minutos para los venenos de *M. lemniscatus*, *M. frontalis*, *M. surinamensis* y *M. nigrocinctus*.

En estudios desarrollados en cultivo celular, se vio que la lemnitoxina una PLA<sub>2</sub> derivada del veneno de *M. lemniscatus*, es citotóxica para miotubos C2C12, sin presentar toxicidad en otros cultivos celulares de mioblastos y células endoteliales. Lo que sugiere que estas PLA<sub>2</sub> en elápidos pueden ejercer su actividad miotóxica de manera específica y no solo

actividad neurotóxica (56,75). Este hallazgo invita a evaluar si las PLA<sub>2</sub> de los venenos estudiados presenten mitotoxicidad.

Los resultados de Viabilidad celular con la prueba de MTT para el cultivo primario de neuronas hipocampales muestran una gran reducción de viabilidad celular en todas las concentraciones ensayadas para el veneno de *Micrurus lemniscatus* (Figura 4-2), lo cual sugiere un marcado efecto neurotóxico y tropismo de este veneno por el tejido nervioso, en el caso de *M. sangilensis* el efecto no fue tan marcado y pudo evidenciarse un comportamiento dosis dependiente, indicando que se puede presentar citotoxicidad pero a altas concentraciones de veneno (Figura 4-4). En el caso del veneno de *Micrurus medemi*, se observó una disminución en su viabilidad respecto al control, sin embargo, las concentraciones ensayadas no presentaron diferencias en cuanto al porcentaje de viabilidad, es decir, es lo mismo usar 2 µg/mL y 100ug/mL. Las diferencias observadas en los ensayos en MTT, podrían estar asociados a diferencias en la concentración de PLA<sub>2</sub> y 3FTx presentes en los venenos, situación que debe ser dilucidada en un análisis venómico integral. De acuerdo a la literatura se podría suponer que la muerte de las neuronas hipocampales, es producto de dos situaciones: la primera por el efecto de las enzimas presentes en el veneno (PLA<sub>2</sub>, svMP, SP, entre otras) y la segunda por aumento de Ca<sup>+2</sup> citosólico, por acción de la PLA<sub>2</sub> sobre los poros transmembranales de la mitocondria(75). La reducción de la viabilidad sobre la línea celular HTB-132, fue menos marcada respecto a lo observado con el cultivo primario de neuronas hipocampales, indicando que hay un menor tropismo por él, sin embargo, para los venenos ML3 y Ms3 (Figura 4-5 y Figura 4-7) hubo una reducción de viabilidad celular al 30% en la concentración de 100 µg/mL, lo cual abre una ventana en la investigación con componentes específicos del veneno frente al cáncer de seno. El veneno de Mm3, aunque redujo la viabilidad celular sobre la línea HTB-132 no presentó un resultado tan marcado (Figura 4-6)



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

El veneno de las diferentes especies de *Micrurus* del presente estudio presentan perfiles electroforéticos y cromatográficos diferentes, indicativo de las diferencias interespecies y geográficas de cada uno de los venenos. El veneno de *M lemniscatus* presentó cromatograma con mayor número de señales, respecto a los otros venenos, indicando que puede existir una mayor diversidad de componentes en él, adicionalmente se encontró una señal con un RT de 80 minutos, diferente a lo registrado *M medemi* y *M sangilensis*.

Las señales obtenidas en el cromatograma permiten presumir estos venenos podrían tener una mayor proporción de PLA<sub>2</sub> respecto a 3FTx, sin embargo, se hace necesario un abordaje proteómico que permita dilucidarlo.

Las actividades enzimáticas de los tres venenos estudiados presentaron variaciones entre ellas, encontrando que la actividad PLA<sub>2</sub> estuvo presente en todos los venenos, incluso fue posible evidenciar una mayor actividad de estos frente al veneno de *Crotalus durissus* empleado como control positivo, diferencia asociada a un mayor porcentaje de PLA<sub>2</sub> en venenos de *Micrurus*. La actividad hialuronidasa se encontró presente en todos los venenos estudiados alrededor de los 68 y 76 kDa, sin embargo, parece tener una mayor actividad para el veneno de *M lemniscatus*, lo cual lo hace un factor importante como elemento dispersante del veneno. En el caso de la actividad proteasa esta es poco observable en los venenos de *M medemi* y *M sangilensis*, sugestivo de una baja participación de metaloproteasas en el proteoma de estas serpientes. El veneno de *M lemniscatus*, mostró una banda clara en el gel copolimerizado con caseína a 51,2 kDa, lo cual puede corresponder a una enzima de tipo metaloproteasa.

De igual manera la actividad biológica del veneno presentó variaciones en los diferentes ensayos planteados (DL<sub>50</sub>, actividad coagulante y citotoxicidad sobre cultivo primario

hipocámpal y línea celular HTB-132), siendo el veneno de *Micrurus lemniscatus* quien presentó una mayor diferenciación frente a los otros venenos al mostrar una mayor reducción en la viabilidad tanto en el cultivo primario como en la línea HTB-132.

## 5.2 Recomendaciones

- Realizar una caracterización proteómica integral de los venenos estudiados, que permita identificar cada uno de sus componentes.
- Separar cada una de las fracciones de los venenos estudiados con el fin de realizar pruebas de citotoxicidad en cultivo primario hipocámpal y líneas celulares tumorales.
- Realizar estudios a nivel genómico y transcriptómico para completar la información de cada uno de los venenos.
- Realizar análisis filogenéticos de las especies *M. lemniscatus*, *M. medemi* y *M. sangilensis* estudiadas, a la luz de los resultados obtenidos.
- Mediante un enfoque antivenómico identificar reconocimiento de los componentes del veneno con antivenenos producidos en el país.

# Anexo A: Aprobación comité de ética



ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 007-095-18  
Fecha: 27 de abril de 2018

Nombre completo del proyecto: "CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DEL VENENO DE SERPIENTES DE ESPECIES *micrurus medemi*, *micrurus sanglensis* y *M. Lemniscatus* DE COLOMBIA".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Janeth Alejandra Bolívar Barbosa

Dirigido por: el profesor Edgar Antonio Reyes Montaña

Presentado por: la profesora Alba Isabel Rodríguez Pulido, Coordinadora Académica

Departamento o Sección: Maestría en Toxicología de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 27 de abril de 2018

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996) actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (junio 18 de 1991).

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo).
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto.
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica).

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

- |   |                                |   |
|---|--------------------------------|---|
| 1 | Amador Luis Roberto            | Departamento de Patología                                   |
| 2 | Arteaga Díaz Clara Eugenia     | Pensionada Dpto. de Morfología                              |
| 3 | Díaz Cruz Luz Amparo           | Departamento de Obstetricia y Ginecología                   |
| 4 | Duarte Gutiérrez Liz Marcela   | Asesora Jurídica Facultad de Medicina                       |
| 5 | Duarte Torres Silvia Cristina  | Departamento de Ocupación Humana                            |
| 6 | Guerrero Fonseca Carlos Arturo | Presidente Comité de Ética / Dpto. de Ciencias Fisiológicas |
| 7 | Parra Pineda Mario Orlando     | Departamento de Obstetricia y Ginecología                   |

[Página 1/1]  
Elaboró: Jeannette Pineda A.

Carretera 30 N°. 45-03  
FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 - 1 piso, Of. 136  
Comuniqué: (57) (1) 316 5000 ext. 15167  
Bogotá, Colombia  
eticasofad\_fm@unal.edu.co

Patrimonio  
de todos  
los colombianos

78 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

Comité de Ética  
Facultad de  
Medicina

Sede Bogotá



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA

3. El Comité consideró que el presente estudio:

- Es válido desde el punto de vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.
- El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un período de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa, del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA ha generado a este respecto.
- Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite Concepto Aprobatorio.

Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA

Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana

Cargo: Presidente Comité de Ética

[Página 2/2]

Elaboró Jeannette Pineda A.

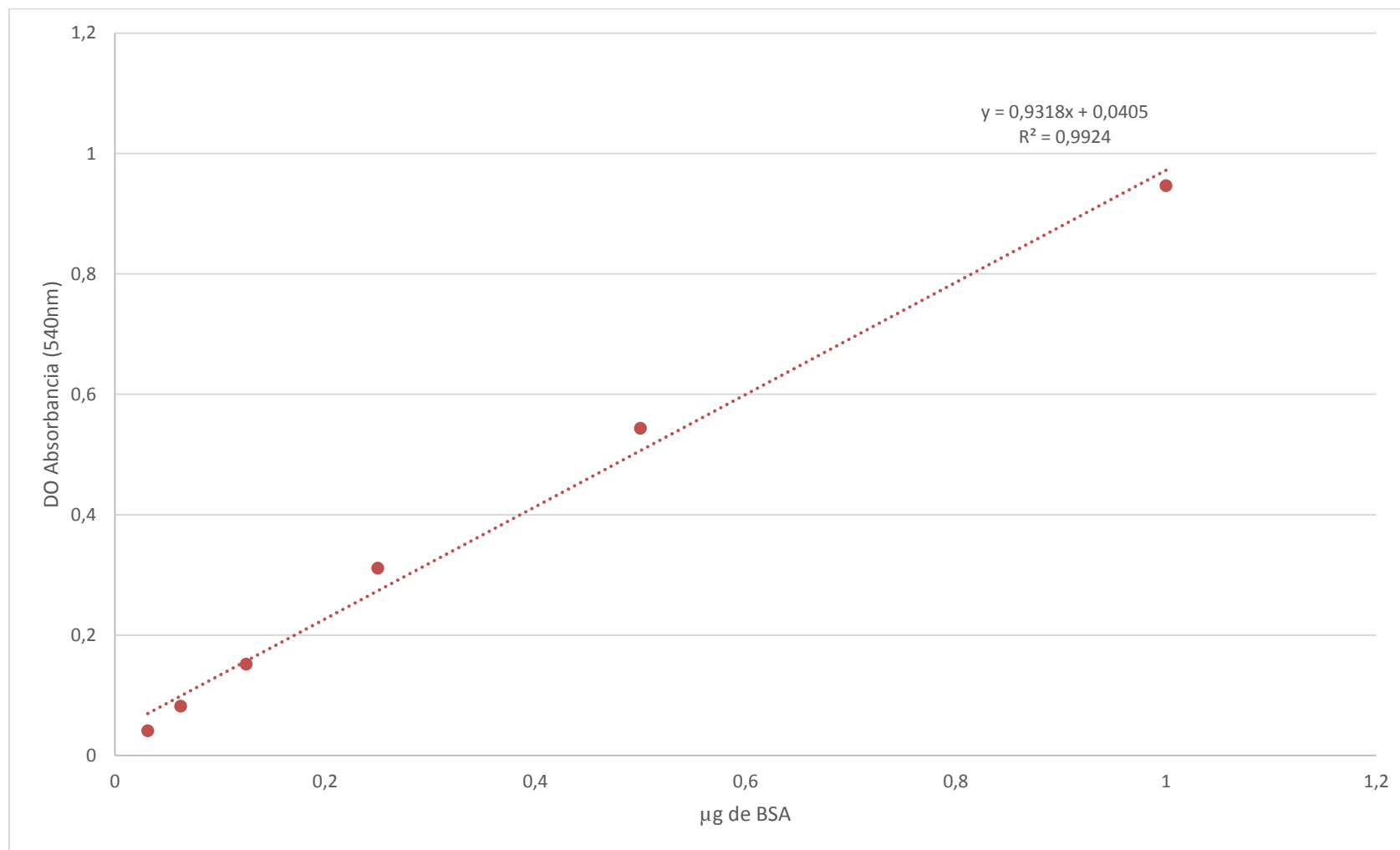
Carrera 30 N°. 45-03  
FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471-1 piso, Of. 136  
Corredor: (57) (1) 316 5000 ext. 15167  
Bogotá, Colombia  
eticasalud\_fmboq@una.edu.co

Patrimonio  
de todos  
los colombianos





## Anexo B: Cuantificación de proteína-BCA

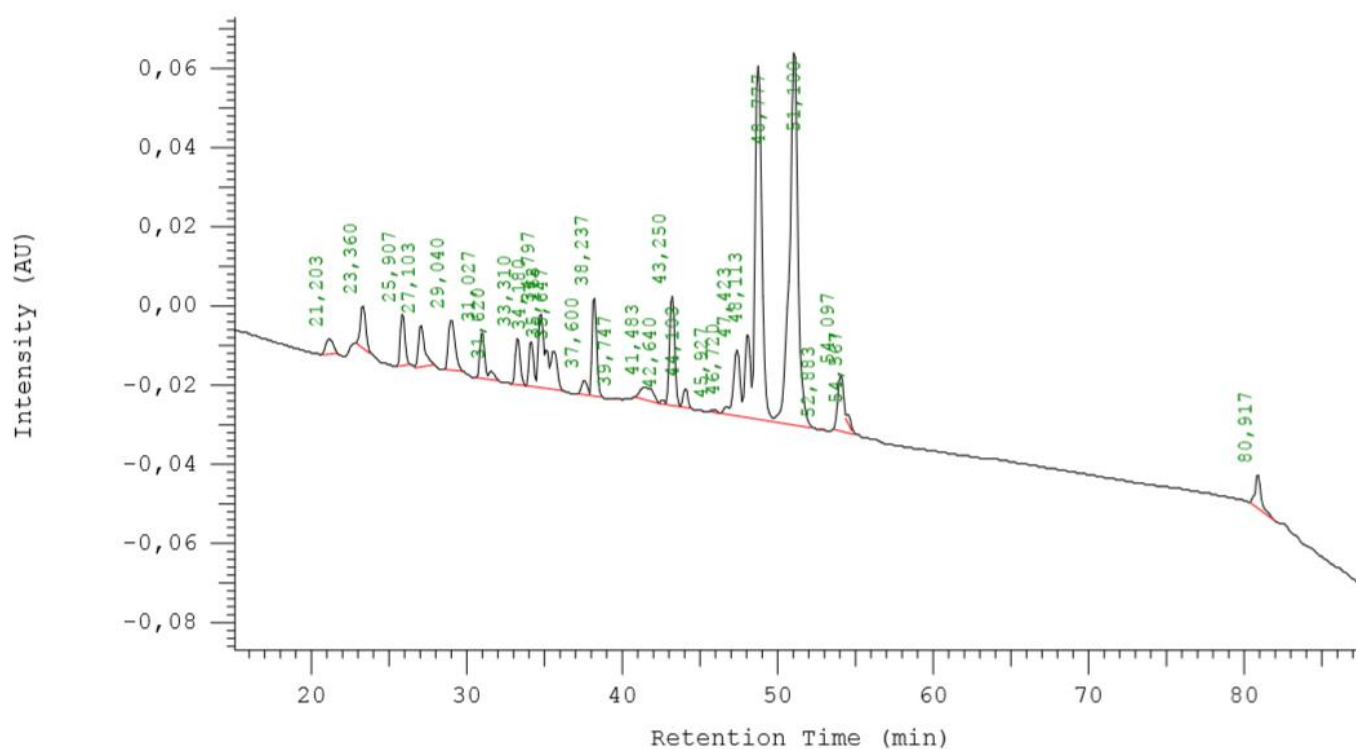


## Anexo C: Especificaciones del equipo de HPLC Hitachi

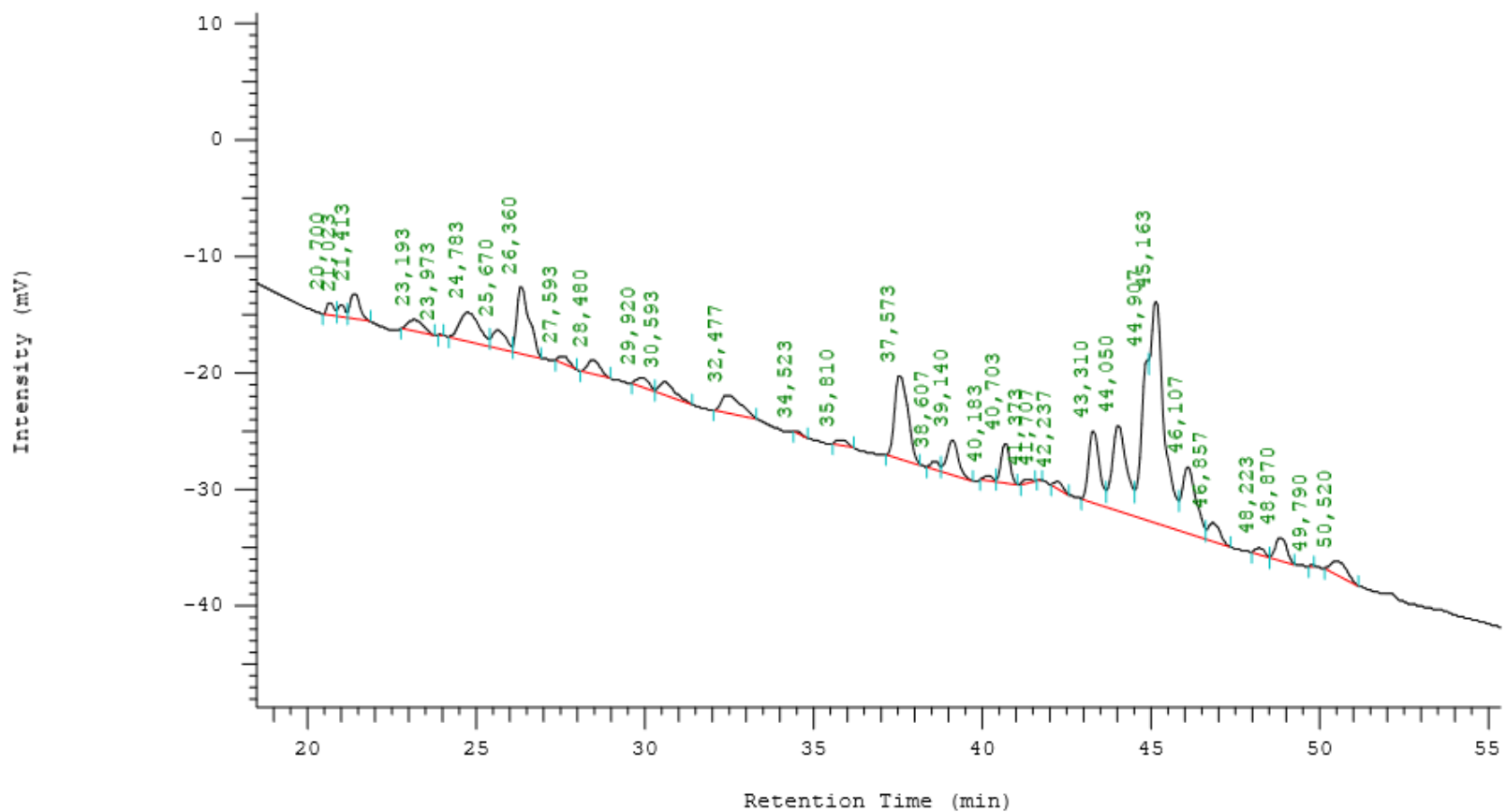
<b>Detector UV CM5410</b>	
Ruido	$0,5 \times 10^{-5}$ AU o menos
Drift	$1,0 \times 10^{-4}$ AU o menos
Exactitud de la longitud de onda	$\pm 1$ nm
<b>Bomba CM5160</b>	
Rango de caudal	0,001 to 5000 mL/min
Exactitud de velocidad del flujo	$\pm 2$ $\mu$ l/min (0,01 - 0,1 mL/min); $\pm 1\%$ (0,101 – 2,5 mL/min)
Precisión de velocidad del flujo	0,075% RSD

## Anexo D: Cromatogramas individuales de cada uno de los venenos

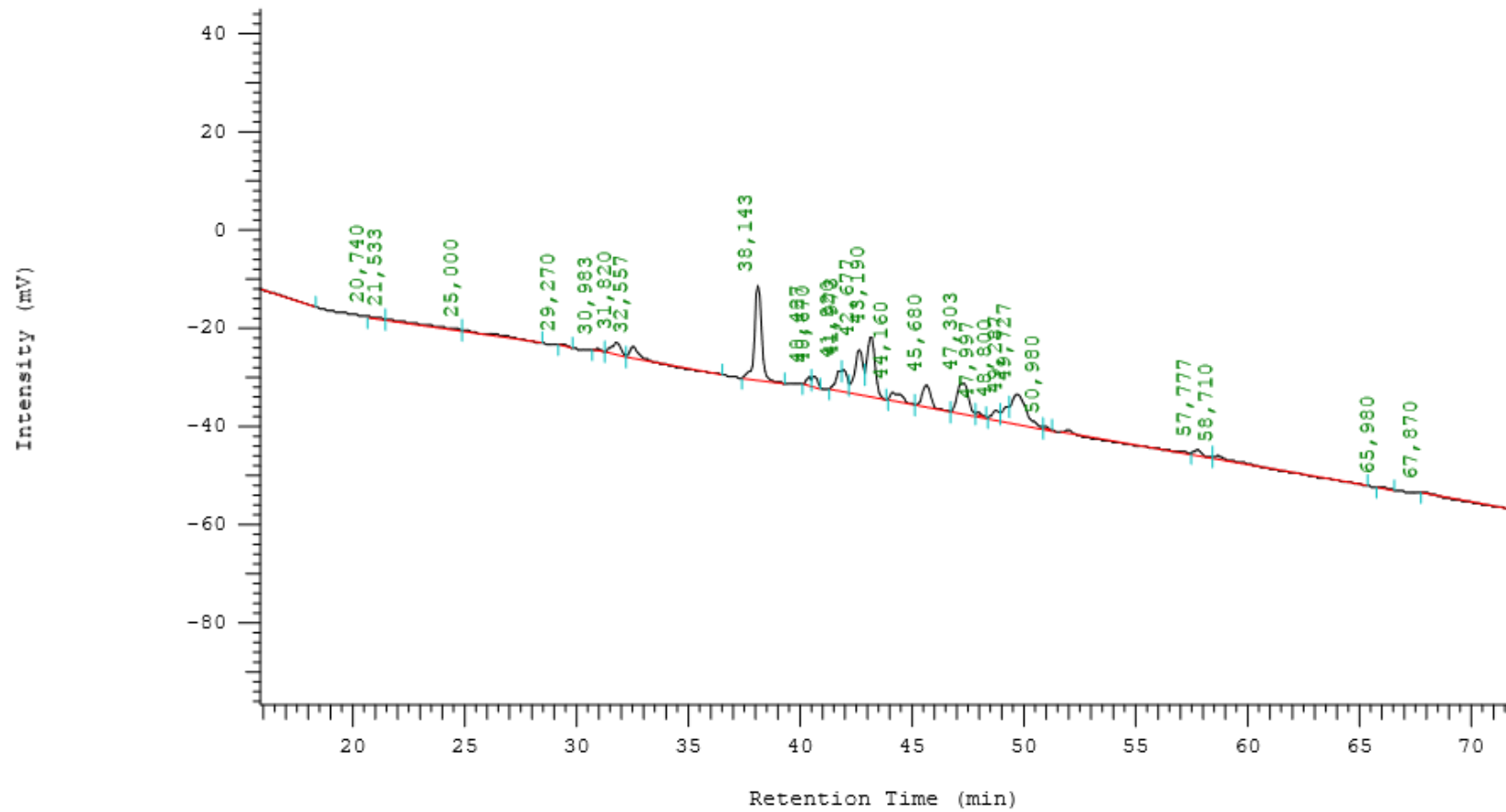
- *Micrurus lemniscatus*



- ***Micrurus medemi***

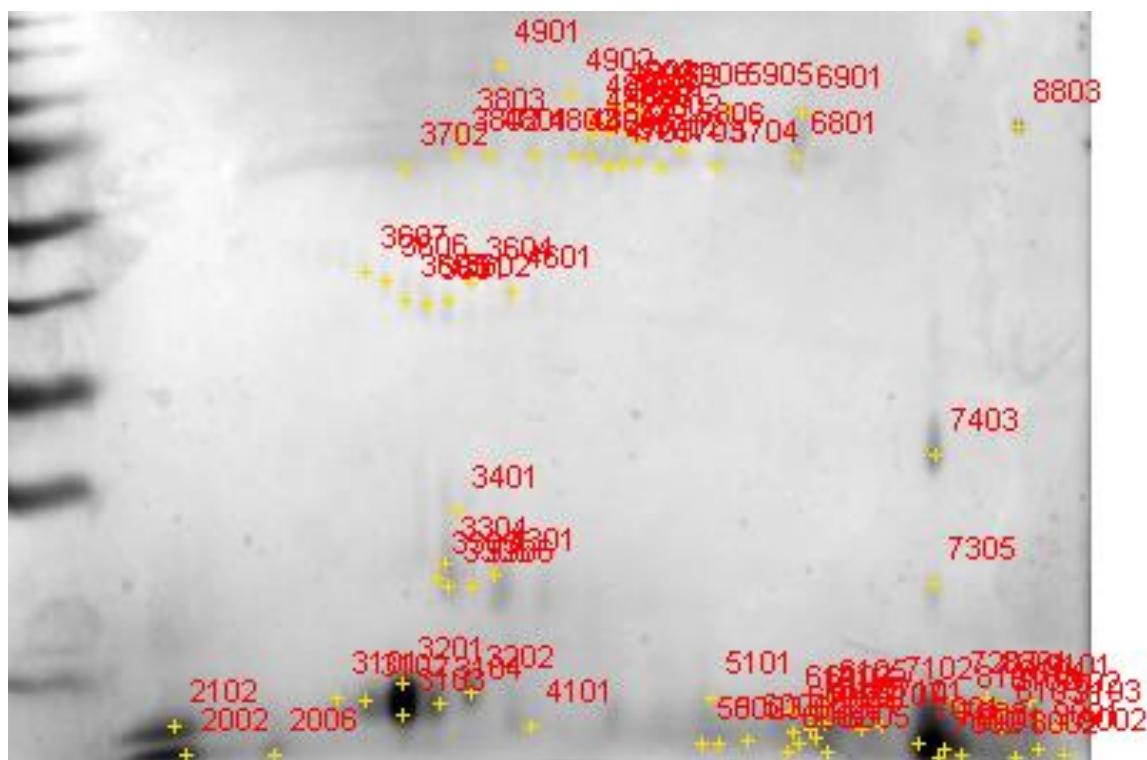


- *Micrurus sangilensis*



## Anexo E: Electroforesis bidimensional

- *Veneno de Micrurus lemniscatus*



JABB; Bio-Rad Laboratories

Sorted by:SSP Quantitation Table

SSP	Mm (kDa)	pI	SSP	Mm (kDa)	pI	SSP	Mm (kDa)	pI	SSP	Mm (kDa)	pI
2001	12.00	3.00	3802	65.98	5.36	5702	64.81	6.78	6107	13.74	8.37
2002	12.12	3.25	3803	70.18	5.40	5703	63.87	6.96	6801	65.78	7.91
2006	12.11	3.95	4101	13.94	5.96	5704	64.10	7.33	6901	80.49	7.94
2102	13.80	3.14	4301	20.75	5.66	5801	71.21	6.68	7001	12.75	8.79
3101	15.89	4.46	4601	44.46	5.80	5802	69.05	6.78	7002	11.99	8.90
3102	15.79	4.70	4701	63.99	6.57	5806	67.55	7.09	7003	12.50	8.91
3103	14.60	4.99	4801	66.15	5.61	5901	84.64	6.71	7101	13.83	8.52
3104	15.47	5.21	4802	66.20	5.98	5902	81.20	6.79	7102	15.60	8.58
3201	17.00	5.00	4804	66.06	6.31	5905	84.36	7.45	7207	16.04	8.93
3202	16.45	5.46	4805	69.85	6.43	5906	83.72	6.98	7305	20.35	8.88

3303	20.72	5.19	4806	65.56	6.43	6001	13.01	7.56	7306	20.58	8.91
3304	21.24	5.26	4807	74.65	6.44	6002	12.25	7.85	7403	26.00	8.90
3305	20.32	5.28	4808	70.47	6.57	6003	12.76	7.93	8001	12.11	8.93
3306	20.41	5.47	4809	75.13	6.58	6004	13.21	8.06	8002	11.89	9.00
3401	23.31	5.35	4901	124.29	5.69	6005	12.24	8.12	8101	14.78	8.93
3601	43.00	5.10	4902	95.00	6.30	6006	11.85	8.30	8102	14.57	8.97
3602	43.31	5.27	4903	84.99	6.60	6101	14.83	7.87	8103	13.80	8.98
3604	45.54	5.46	5001	12.25	6.86	6102	13.45	7.89	8104	15.33	8.98
3605	43.19	5.00	5002	12.79	7.24	6103	14.79	8.01	8201	15.96	8.96
3606	45.83	4.85	5003	12.81	7.36	6104	13.65	8.02	8803	72.00	9.00
3607	47.18	4.69	5101	1587	7.29	6105	15.21	8.11	8903	164.02	8.95
3702	63.22	5.01	5701	64.78	6.66	6106	14.13	8.12			

- **Veneno de *M. medemi***



JABB; Bio-Rad Laboratories

Sorted by: SSP Quantitation Table

SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI
1502	55.00	3.00	3503	57.16	4.69	5107	27.68	5.84	6502	50.48	6.39
1503	52.21	3.46	3504	57.55	4.37	5201	28.67	5.43	6601	66.74	5.89

86 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*,  
*Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

---

1606	72.00	3.60	3601	64.28	4.36	5301	33.42	5.44	7101	25.07	6.47
1607	70.44	3.70	3602	64.37	4.60	5302	40.67	5.46	7201	33.05	6.47
2001	24.66	4.04	4101	26.73	5.04	5303	42.08	5.70	7202	32.74	6.59
2002	24.59	4.28	4102	25.28	5.09	5304	35.68	5.87	7203	28.53	6.51
2101	25.53	3.88	4103	25.32	5.14	5401	47.02	5.69	7301	41.87	6.42
2102	25.11	4.02	4104	25.48	5.28	5501	50.64	5.49	7302	35.50	6.48
2103	25.07	4.25	4105	25.30	5.41	5502	49.64	5.62	7303	34.40	6.59
2104	25.73	4.25	4301	33.49	5.06	5503	49.79	5.76	7304	33.30	6.72
2201	28.31	4.27	4302	42.43	5.09	5601	69.35	5.64	7401	46.50	6.41
2301	33.94	3.86	4501	49.66	4.93	6101	25.76	5.98	7402	45.97	6.56
2302	34.00	4.30	4502	57.11	4.96	6102	25.15	6.19	7403	45.96	6.67
2501	51.77	3.82	4503	49.91	5.28	6201	30.70	6.14	7404	48.98	6.69
2502	50.89	4.02	4504	57.00	5.31	6202	29.34	6.21	7501	49.78	6.53
2503	52.38	4.29	4601	70.31	5.39	6203	28.85	5.99	7502	56.12	6.73
2504	50.99	4.32	4602	70.92	5.26	6301	43.00	6.10	7503	56.54	6.61
3101	24.99	4.43	4603	73.65	5.06	6302	34.85	6.19	7601	61.55	6.73
3102	26.51	4.49	4604	62.89	5.11	6303	42.54	6.26	8102	26.00	9.00
3103	24.93	4.75	5101	26.06	5.46	6304	36.48	6.31	8301	35.78	6.87
3104	27.50	4.87	5102	25.26	5.51	6305	34.52	6.39	8302	33.74	7.06
3201	31.83	4.70	5103	27.97	5.57	6306	42.08	5.89	8401	48.13	6.85
3301	40.84	4.52	5104	25.42	5.65	6401	48.06	5.94	8402	48.99	7.08
3501	50.82	4.59	5105	27.76	5.70	6402	45.76	6.25	8601	61.78	6.87
3502	50.03	4.79	5106	25.84	5.82	6501	51.01	5.95	8602	61.55	7.03



## Anexo F: Análisis estadístico ensayos de citotoxicidad

- Prueba de Citotoxicidad en cultivo primario hipocampal

### Veneno de *M. lemniscatus*

```
AnovaModel.lem <- aov(X..Viabilidad ~ Concentración, data=lemhip)
```

```
> summary(AnovaModel.lem)
```

	Df	Sum Sq	Mean sq	F value	Pr(>F)	
Concentración	5	22001	4400	65,2	1,73E-10	***
Residuals	17	1147	67			

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = X..Viabilidad ~ Concentración, data = lemhip)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std Error	t value	Pr(> t )	
2-Control	-80,8397	5,8089	-13,917	<0,0001	***
3-Control	-82,7990	6,2743	-13,197	<0,0002	***
12-Control	-76,6412	5,8089	-13,194	<0,0003	***
50-Control	-85,0382	5,8089	-14,639	<0,0004	***
100-Control	-81,6412	5,8089	-14,055	<0,0005	***
3-2	-1,9593	6,2743	-0,312	1,000	
12-2	4,1985	5,8089	0,723	0,976	
50-2	-4,1985	5,8089	-0,723	0,976	
100-2	-0,8015	5,8089	-0,138	1,000	
12-3	6,1578	6,2743	0,981	0,918	
50-3	-2,2392	6,2743	-0,357	0,999	
100-3	1,1578	6,2743	0,185	1,000	
50-12	-8,3969	5,8089	-1,446	0,700	
100-12	-5,0000	5,8089	-0,861	0,951	

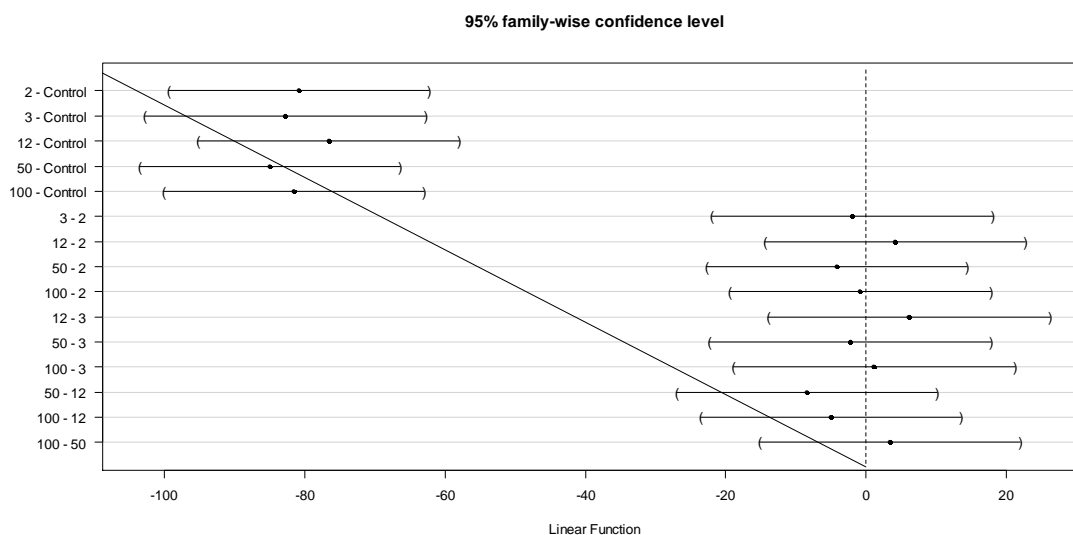
88 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

100-50	3,3969	5,8089	0,585	0,991	
--------	--------	--------	-------	-------	--

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)



**Veneno de *M. medemi***

```
AnovaModel.medhip <- aov(X..Viabilidad ~ Concentración, data=medhip)
```

```
> summary(AnovaModel.medhip)
```

	Df	Sum Sq	Mean sq	F value	Pr(>F)	
Concentración	5	9562	1912,4	5,826	0,00227	**
Residuals	18	5908	328,2			

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = ABS ~ ESPECIE, data = medhip)

Linear Hypotheses:

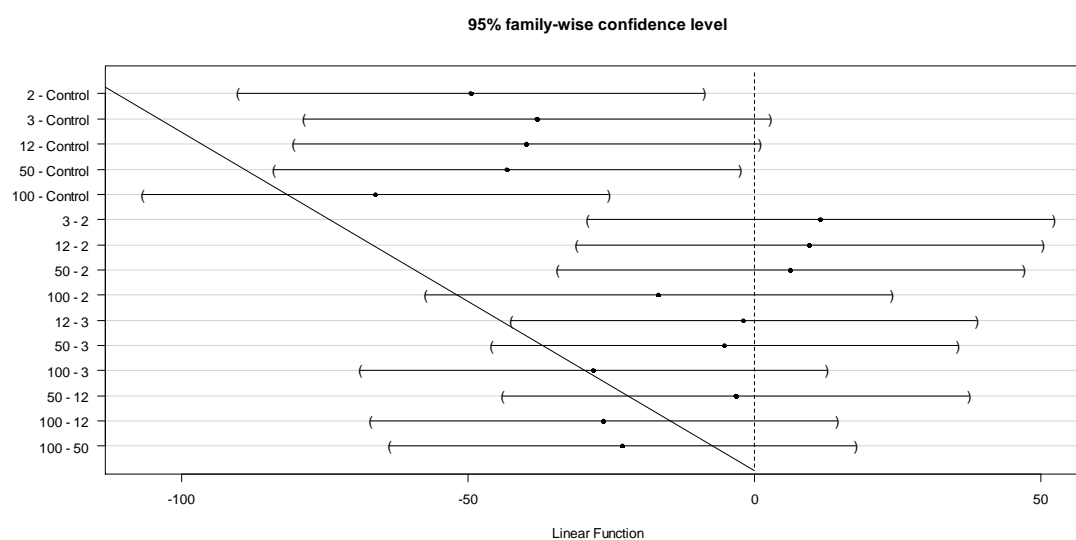
	Estimate	Std Error	t value	Pr(> t )	
2-Control	-49,5040	12,811	-3,864	0,0123	*

3-Control	-38,0150	12,811	-2,967	0,0753	.
12-Control	-39,8850	12,811	-3,113	0,0567	.
50-Control	-43,2060	12,811	-3,373	0,0339	*
100-Control	-66,2210	12,811	-5,169	<0,001	***
3-2	11,4890	12,811	0,897	0,9423	
12-2	9,6180	12,811	0,751	0,9723	
50-2	6,2980	12,811	0,492	0,9959	
100-2	-16,7180	12,811	-1,305	0,7787	
12-3	-1,8700	12,811	-0,146	1,0000	
50-3	-5,1910	12,811	-0,405	0,9983	
100-3	-28,2060	12,811	-2,202	0,2841	
50-12	-3,3210	12,811	-0,259	0,9998	
100-12	-26,3360	12,811	-2,056	0,3516	
100-50	-23,0150	12,811	-1,797	0,4918	

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)



### Veneno de *M. sangilensis*

```
> AnovaModel.sanhip <- aov(ABS ~ Concentración, data=sanhip)
```

```
> summary(AnovaModel.sanhip)
```

	Df	Sum Sq	Mean sq	F value	Pr(>F)	
--	----	--------	---------	---------	--------	--

90 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*,  
*Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

---

Concentración	5	21838	4368	5,208	0,00395	**
Residuals	18	15096	839			

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

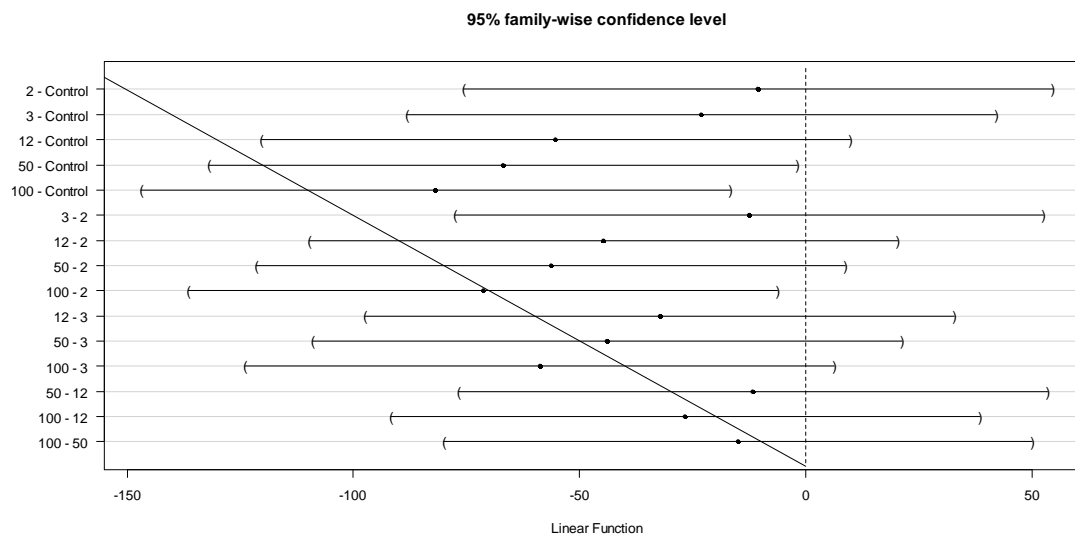
### Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = ABS ~ Concentración, data = sanhip)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std Error	t value	Pr(> t )	
2-Control	-10,5300	20,48	-0,514	0,99490	
3-Control	-23,0200	20,48	-1,124	0,86520	
12-Control	-55,2300	20,48	-2,697	0,12439	
50-Control	-66,8700	20,48	-3,265	0,04213	*
100-Control	-81,8300	20,48	-3,996	0,00938	**
3-2	-12,4800	20,48	-6,09	0,98893	
12-2	-44,6900	20,48	-2,183	0,29281	
50-2	-56,3400	20,48	-2,751	0,11305	
100-2	-71,3000	20,48	-3,482	0,02714	*
12-3	-32,2100	20,48	-1,573	0,62489	
50-3	-43,8500	20,48	-2,142	0,31087	
100-3	-58,8200	20,48	-2,872	0,09011	.
50-12	-11,6400	20,48	-0,568	0,99193	
100-12	-26,6000	20,48	-1,299	0,78178	
100-50	-14,9600	20,48	-0,731	0,97539	



- Prueba de Citotoxicidad en línea celular HTB-132 (Cáncer de Seno)

### Veneno de *M. lemniscatus*

```
> AnovaModel.lemhtb132 <- aov(X.Viabilidad.MI ~ Tratamiento, data=htb132)
```

```
> summary(AnovaModel.lemhtb132)
```

	Df	Sum Sq	Mean sq	F value	Pr(>F)	
Tratamiento	4	17067	4267	37,68	0,000000237	***
Residuals	14	1585	113			

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = X.Viabilidad.MI ~ Tratamiento, data = htb132)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std Error	t value	Pr(> t )	
2-Control	-17,308	7,524	-2,3	0,2015	
3-Contro	-24,009	8,127	-2,954	0,0668	.
25-Control	-32,462	7,524	-4,314	0,0054	**
100-Control	-86,59	7,524	-11,508	<0,001	***
3-2	-6,701	8,127	-0,825	0,9185	

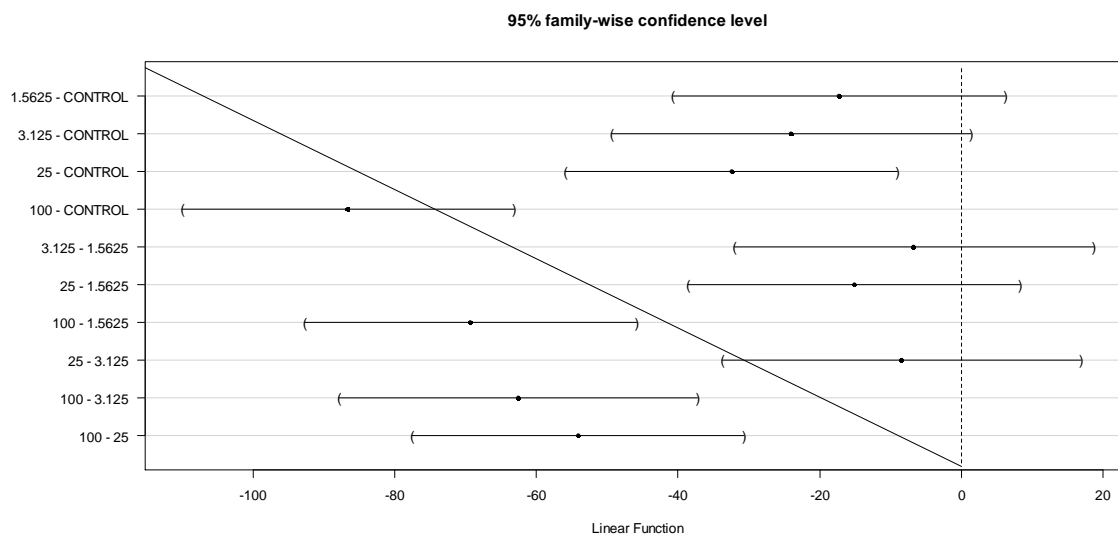
92 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*,  
*Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

25-2	-15,154	7,524	-2,014	0,3086	
100-2	-69,282	7,524	-9,208	<0,001	***
25-3	-8,453	8,127	-1,04	0,8325	
100-3	-62,581	8,127	-7,7	<0,001	***
100-25	-54,128	7,524	-7,194	<0,001	***

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)



**Veneno de *M. medemi***

```
> AnovaModel.medhtb132 <- aov(X.Viabilidad.Mm ~ Tratamiento, data=htb132)
```

```
> summary(AnovaModel.medhtb132)
```

	Df	Sum Sq	Mean sq	F value	Pr (>F)	
Tratamiento	4	12962	3241	25,03	0,00000173	***
Residuals	15	1942	129			

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

#### Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = X.Viabilidad.Mm ~ Tratamiento, data = htb132)

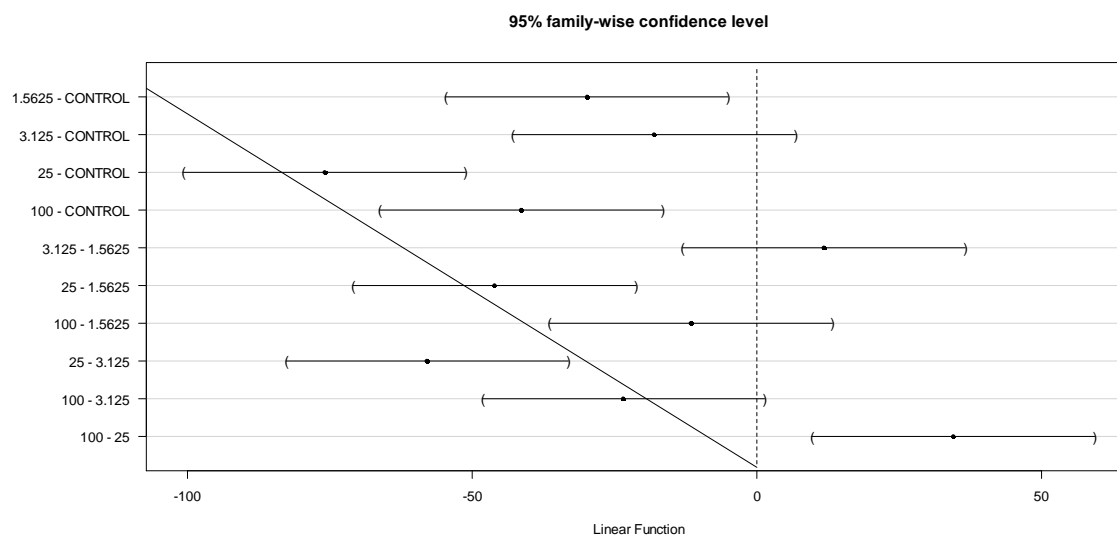
#### Linear Hypotheses:

	Estimate	Std Error	t value	Pr(> t )	
1,5625-Control	29,872	8,046	3,713	0,01521	*
3,125-Control	18,051	8,046	2,244	0,21693	
25-Control	75,974	8,046	9,443	<0,001	***
100-Control	41,462	8,046	5,143	0,001	***
3,125-1,5625	11,821	8,046	1,469	0,59594	
25-1,5625	46,103	8,046	5,73	0,001	***
100-1,5625	11,59	8,046	1,44	0,61297	
25-3,125	57,923	8,046	7,199	<0,001	***
100-3,125	23,41	8,046	2,91	0,06939	.
100-25	34,513	8,046	4,29	0,00499	**

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)



94 Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*,  
*Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia.

---

**Veneno de *M. sangilensis***

```
> AnovaModel.sanhtb132 <- aov(X.Viabilidad.Ms ~ Tratamiento, data=htb132)
```

```
> summary(AnovaModel.sanhtb132)
```

	Df	Sum Sq	Mean sq	F value	Pr(>F)	
Tratamiento	4	16646	4162	34,58	0,000000818	***
Residuals	13	1565	120			

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = X.Viabilidad.Ms ~ Tratamiento, data = htb132)

Linear Hypotheses:

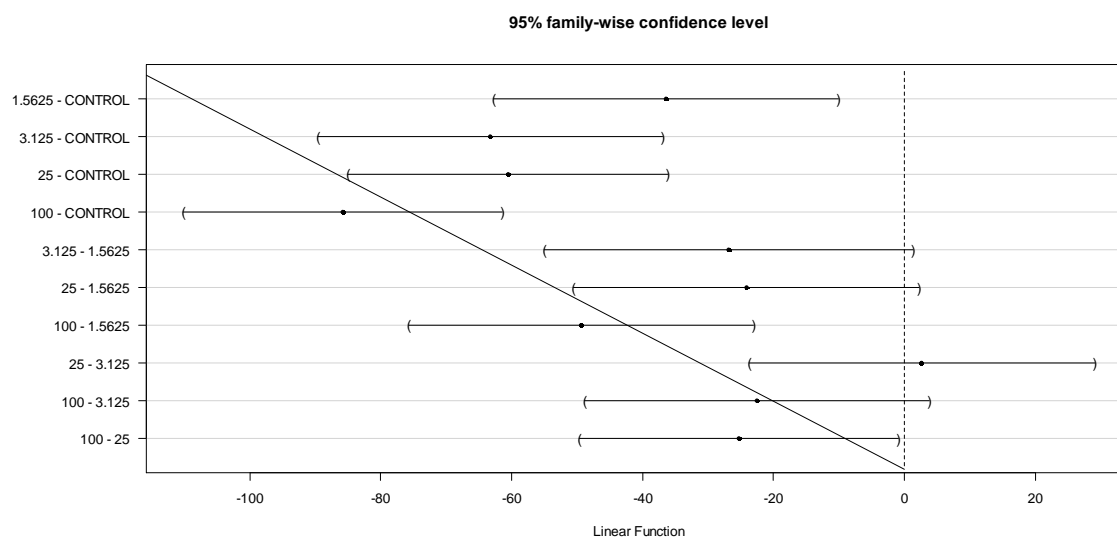
	Estimate	Std Error	t value	Pr(> t )	
1,5625-Control	-36,419	8,379	-4,346	0,00592	**
3,125-Control	-63,259	8,379	-7,549	<0,001	***
25-Control	-60,564	7,757	-7,807	<0,001	***
100-Control	-85,821	7,757	-11,063	<0,001	***
3,125-1,5625	-26,838	8,958	-2,996	0,06510	.
25-1,5625	-24,145	8,379	-2,882	0,07935	.
100-1,5625	-49,402	8,379	-5,896	<0,001	***
25-3,125	2,692	8,379	0,321	0,99737	
100-3,125	-22,564	8,379	-2,693	0,10914	
100-25	-25,256	7,757	-3,256	0,04125	*

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)







## 6. Bibliografía

1. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. 2010;56(7):1223–35.
2. Rojas AM. Informe evento accidente ofídico, periodo epidemiológico XI Colombia, 2018. Bogotá; 2018.
3. Costa J, de Siquerira F, Hui F, Santána C, Haddad V. Animais Peconhentos no brasil. 2nd ed. Butantan: Sarvier; 2009. 540 p.
4. Hodgson WC, Wickramaratna JC. In vitro neuromuscular activity of snake venoms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:807–14.
5. Bon C, Choumet V, Delot E, Faure G, Robbe-Vincent A, Saliou B. Different evolution of phospholipase A2 neurotoxins (beta-neurotoxins) from Elapidae and Viperidae snakes. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Mar 9;710(1 Toxins and Ex):142–8.
6. Renjifo C, Smith EN, Hodgson WC, Renjifo JM, Sanchez A, Acosta R, et al. Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: an evolutionary perspective. *Toxicon*. 2012 Jan;59(1):132–42.
7. Lynch J, Angarita T, Ruiz-Gómez F. Programa nacional para la conservacion de las serpientes presentes en Colombia. 2016. 128 p.
8. Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of the western hemisphere. 1st ed. New York: Cornell University; 2004.
9. Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, et al. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*. 2016 Nov;122:7–25.
10. Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Pedraza-Escalona M, Restano-Cassulini R, Zamudio FZ, Benard-Valle M, et al. New insights into the proteomic characterization of the coral snake *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*. 2018 Oct;153(July):23–31.

11. Lippa E, Török F, Gómez A, Corrales G, Chacón D, Sasa M. First look into the venom of Roatan Island ' s critically endangered coral snake *Micrurus ruatanus*: Proteomic characterization , toxicity , immunorecognition and neutralization by an antivenom. J Proteomics. 2019;(December 2018):1–9.
12. Feitosa DT, Da Silva NJJ, Pires MG, Zaher H, Prudente AL da C. A new species of monadal coral snake of the genus *Micrurus* (Serpentes, Elapidae) from western Amazon. Zootaxa. 2015 Jun 24;3974(4):538.
13. Henao Duque AM, Núñez Rangel V. Maintenance of red-tail coral snake (*Micrurus mipartitus*) in captivity and evaluation of individual venom variability. Acta Biológica Colomb. 2016 Aug 30;21(3):593.
14. Rey-Suárez P, Núñez V, Saldarriaga-Córdoba M, Lomonte B. Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A 2 from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. Biochimie Jun, 2017 p. 88–98.
15. Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. J Proteomics. 2011 Dec 21;75(2):655–67.
16. Rey-Suárez P, Núñez V, Fernández J, Lomonte B. Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. J Proteomics. 2016 Mar 16;136:262–73.
17. Da Silva NJ, Aird SD. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2001 Mar;128(3):425–56.
18. Roze JA. Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification, and Venoms. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company; 1996. 328 p.
19. Tanaka GD, Furtado MFD, Portaro FC V, Sant'Anna OA, Tambourgi D V. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. de Silva HJ, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Mar 9;4(3):1–12.
20. Universidad de Costa Rica, Instituto Clodomiro Picado. Determinación de Actividades Tóxicas de Venenos de Serpientes y Neutralización por Antivenenos.

- Manual de métodos de laboratorio. 2007. 1-28 p.
21. Pla D, Sanz L, Sasa M, Acevedo ME, Dwyer Q, Durban J, et al. Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). J Proteomics. 2017;
  22. Lomonte B, Sasa M, Rey-Suárez P, Bryan W, Gutiérrez JM. Venom of the Coral Snake *Micrurus clarki*: Proteomic Profile, Toxicity, Immunological Cross-Neutralization, and Characterization of a Three-Finger Toxin. Toxins (Basel). 2016 May 5;8(5):138.
  23. Diz AP, Calvete JJ. Ecological proteomics: is the field ripe for integrating proteomics into evolutionary ecology research? J Proteomics. 2016 Mar;135:1–3.
  24. Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LRC, Villalta M, et al. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. Toxicon. 2010;
  25. Calvete JJ. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. Toxicon. 2013 Dec 1;75:44–62.
  26. León-Núñez J, Rojas A. Informe del evento accidente ofídico hasta el periodo epidemiológico XIII Colombia, 2017. Inst Nac Salud- SIVIGILA. 2017;30.
  27. Meier J, Sotcker KF. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: Meier J, White J, editors. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. New York: Informa Healthcare; 2008. p. 752.
  28. Rosenberg HI. Histology, histochemistry, and emptying mechanism of the venom glands of some elapid snakes. J Morphol. 1967 Oct;123(2):133–55.
  29. Xiong S, Huang C. Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. Toxicol Lett. 2018;287:142–54.
  30. Kopper RA, Harper GR, Zimmerman S, Hook J. Comparison of total protein and phospholipase A2 levels in individual coral snake venoms. Toxicon. 2013;76:59–62.
  31. Utkin YN. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom--milestones of discovery. Toxicon. 2013 Feb;62:50–5.
  32. McCleary RJR, Kini RM. Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. Toxicon. 2013;62:56–74.
  33. Cecchini AL, Marcussi S, Silveira LB, Borja-Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, Amara S, et al. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms.

- Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2005 Jan;140(1):125–34.
34. Fernández J, Alape-Girón A, Angulo Y, Sanz L, Gutiérrez JM, Calvete JJ, et al. Venomic and Antivenomic Analyses of the Central American Coral Snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). J Proteome Res. 2011 Apr;10(4):1816–27.
  35. Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. Toxicon. 2003 Dec 15;42(8):827–40.
  36. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. Toxicon. 2013;62:27–39.
  37. Rigoni M, Paoli M, Milanesi E, Caccin P, Rasola A, Bernardi P, et al. Snake Phospholipase A 2 Neurotoxins Enter Neurons , Bind Specifically to Mitochondria , and Open Their Transition Pores. J Biol Chem. 2008;283(49):34013–20.
  38. Barber CM, Isbister GK, Hodgson WC. Alpha neurotoxins. Toxicon. 2013;66:47–58.
  39. Kini RM, Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. Toxicon. 2010 Nov;56(6):855–67.
  40. Nirthanan S, Gopalakrishnakone P, Gwee MCE, Khoo HE, Kini RM. Non-conventional toxins from Elapid venoms. Toxicon. 2003;41(4):397–407.
  41. Rodrigues-Simioni L, Rey-Suárez P, Floriano RS, Lomonte B, Saldarriaga-Córdoba M, Rostelato-Ferreira S, et al. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). Toxicon. 2012;60(5):851–63.
  42. Pereáñez Jiménez JA, Vargas Muñoz LJ. Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina. Iatreia. 2009;22(4):382–91.
  43. Palomino M, Lazo F, Delgadillo J, Severino R, Yarlequé A. Purificación de una lectina tipo C del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Soc Química Perú. 2012;78(3):161–9.
  44. Boldrini-França J, Cologna CT, Pucca MB, De Castro K, Bordon F, Amorim FG, et al. Minor snake venom proteins: structure, function and potential applications. BBA - Gen Subj. 2017;1861(4):824–38.
  45. Masci PP, Lavin MF, Guddat LW, Trabi M, de Jersey J, Millers E-KI. Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake ( *Pseudonaja textilis* ) . FEBS J. 2009;276(11):3163–75.
  46. Fox JW. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. Toxicon.

- 2013;62:75–82.
47. Serrano SMT. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*. 2013;62:19–26.
  48. Fernández J, Vargas-Vargas N, Pla D, Sasa M, Rey-Suárez P, Sanz L, et al. Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus mosquitensis* from the Caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in New World elapids. *Toxicon*. 2015 Dec 1;107(Pt B):217–33.
  49. Corrêa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo I de LM, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves MLM, et al. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics*. 2011 Aug 24;74(9):1795–809.
  50. Ciscotto PHC, Rates B, Silva DAF, Richardson M, Silva LP, Andrade H, et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J Proteomics*. 2011 Aug 24;74(9):1810–25.
  51. Vergara I, Pedraza-Escalona M, Paniagua D, Restano-Cassulini R, Zamudio F, Batista CVF, et al. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. *J Proteomics*. 2014 Jun 13;105:295–306.
  52. Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Restano-Cassulini R, Pando V, Villa-Hernandez O, Zavaleta-Martínez-Vargas A, et al. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. 2008 May;8(9):1919–32.
  53. Bénard-Valle M, Carbajal-Saucedo A, de Roodt A, López-Vera E, Alagón A. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*. 2014 Jan;77:6–15.
  54. Sanz L, Pla D, Pérez A, Rodríguez Y, Zavaleta A, Salas M, et al. Venomic analysis of the poorly studied desert coral snake, *Micrurus tschudii tschudii*, supports the 3FTx/PLA2 dichotomy across *Micrurus* venoms. *Toxins (Basel)*. 2016;8(6):9–12.
  55. Salazar AM, Vivas J, Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Ibarra C, Gil A, et al. Hemostatic and toxinological diversities in venom of *Micrurus tener tener*, *Micrurus fulvius fulvius* and *Micrurus isozonus* coral snakes. *Toxicon*. 2011 Jul;58(1):35–45.
  56. Casais-E-Silva LL, Teixeira CFP, Lebrun I, Lomonte B, Alape-Girón A, Gutiérrez JM. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a

- myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. *Toxicol Lett.* 2016 Aug 22;257:60–71.
57. Oliveira DA, Harasawa C, Seibert CS, Casais e Silva LL, Pimenta DC, Lebrun I, et al. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. *Brain Res Bull.* 2008;75(5):629–39.
58. WHO. Annex 5. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964. WHO Tech Rep Ser. 2017;197–388.
59. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct 25;150(1):76–85.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
61. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987;166(2):368–79.
62. Meyer TS, Lamberts BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subj.* 1965;107(1):144–5.
63. Switzer RC, Merrill CR, Shifrin S. A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Peptides in Polyacrylamide Gels. *Ouest Med.* 1979;98:231–7.
64. Calvete JJ. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon.* 2013;75:44–62.
65. da Silva Jr NJ, Griffin PR, Aird SD. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B.* 1991 Jan;100B(1):117–26.
66. Sanz L, Pla D, Pérez A, Rodríguez Y, Zavaleta A, Salas M, et al. Venomic Analysis of the Poorly Studied Desert Coral Snake, *Micrurus tschudii tschudii*, Supports the 3FTx/PLA2 Dichotomy across *Micrurus* Venoms. *Toxins (Basel).* 2016 Jun 7;8(179):1–12.
67. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom.* 2007 Nov;42(11):1405–14.
68. Lomonte B, Calvete JJ. Strategies in “snake venomomics” aiming at an integrative view



- of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017;23(1):1–12.
69. Aird SD, Da Silva NJ. Comparative enzymatic composition of brazilian coral snake (*Micrurus*) venom. *Comp Biochem Physiol*. 1991;99B(2):287–94.
70. de Araújo AL, Radvanyi F. Determination of phospholipase A<sub>2</sub> activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon*. 1987;25(11):1181–8.
71. Memar B, Jamili S, Shahbazzadeh D, Bagheri KP. The first report on coagulation and phospholipase A<sub>2</sub> activities of Persian Gulf lionfish, *Pterois russelli*, an Iranian venomous fish. *Toxicon*. 2016;113:25–31.
72. Cevallos MA, Navarro-Duque C, Varela-Julia M, Alagon AC. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon*. 1992;30(8):925–30.
73. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem*. 1980;102(1):196–202.
74. Pérez AA. Análisis preliminar de los componentes proteicos del veneno del pez león *Pterois volitans* de la costa de Santa Marta y evaluación de su actividad biológica. Universidad Nacional de Colombia; 2018.
75. de Carvalho ND, Garcia RC, Kleber Ferreira A, Rodrigo Batista D, Cassola AC, Maria D, et al. Neurotoxicity of coral snake phospholipases A<sub>2</sub> in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 2014 Mar;1552:1–16.
76. Luo J-H, Fu Z-Y, Losi G, Kim BG, Prybylowski K, Vissel B, et al. Functional expression of distinct NMDA channel subunits tagged with green fluorescent protein in hippocampal neurons in culture. *Neuropharmacology*. 2002 Mar;42(3):306–18.
77. Beaudoin GMJ, Lee S-H, Singh D, Yuan Y, Ng Y-G, Reichardt LF, et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc*. 2012 Sep 30;7(9):1741–54.
78. Reyes-Guzman EA, Vega-Castro N, Reyes-Montaña EA, Recio-Pinto E. Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed. *BMC Neurosci*. 2017 May 16;18(1):44.
79. American Type Culture Collection. ATCC the Global Bioresource Center [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 3]. Available from: <https://www.atcc.org/search#q=htb132&sort=relevancy>
80. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.